

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**ESTUDIO DE LAS ACCIONES DE  
PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS  
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T**

**Raquel Nieto Pintado**

Madrid, 2015



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**ESTUDIO DE LAS ACCIONES DE  
PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS  
SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en  
Bioquímica, biología molecular, biomedicina y biotecnología  
por:

**Raquel Nieto Pintado**, licenciada en Biología

Trabajo dirigido por:

**Miguel Ángel Íñiguez Peña**

en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)





*Este trabajo de Tesis ha sido financiado por las ayudas a los proyectos “Regulación de la expresión de genes responsables de la producción de prostaglandinas y análisis de su función en cardiomiocitos y macrófagos. Implicaciones en la fisiopatología cardiovascular” (BFU2007-62659/BMC), “Mediadores inflamatorios lipídicos en la fisiopatología cardiovascular” (BFU2010-21055) y “Acciones de prostanoides y ligandos del receptor LXR en procesos inflamatorios y sus implicaciones en la fisiopatología cardiovascular” (SAF2011-23971) otorgadas por el MEC, MICINN y MINECO respectivamente.*



## **ABSTRACT / RESUMEN**

---





Prostaglandins (PGs) are lipid mediators involved in a wide variety of biological processes including inflammatory responses, maintenance of cellular and tissue homeostasis and the regulation of pathophysiological processes. Cyclopentenone prostaglandins (CyPGs) include  $\text{PGA}_1$  and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - $\text{PGJ}_2$  (15d-PGJ<sub>2</sub>), which are formed by dehydration of  $\text{PGE}_1$  and  $\text{PGD}_2$ , respectively. CyPGs exhibit anti-inflammatory, anti-tumor and anti-viral properties by activating peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- $\gamma$  or through covalent cysteine modification of cellular proteins, altering their function.

This work analyses 15d-PGJ<sub>2</sub> and  $\text{PGA}_1$  actions in human T lymphocyte activation through the analysis of their influence on different parameters, including cell proliferation, cell viability, migration and gene expression. In general, the results obtained show an inhibitory effect of these CyPGs on T cell activation. They decreased cell proliferation, being this effect most evident in the case of 15d-PGJ<sub>2</sub>. They also negatively regulated T lymphocyte migration in response to the chemokine SDF-1 $\alpha$ , with a decrease in actin filament polymerization. Moreover, 15d-PGJ<sub>2</sub> and  $\text{PGA}_1$  interfered with T cell gene expression. In the presence of these CyPGs, the expression pattern of several genes involved in T lymphocyte physiology was altered, both in basal and after cell activation conditions. Expression of genes necessities for immune response and inflammatory process as IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  or COX-2, among others, was substantially decreased in presence of CyPGs. The use of structural and functional analogues of CyPGs like 2-Cyclopenten-1-one or CAY10410, which differ in their reactivity to thiol groups or their capacity to activate PPAR $\gamma$ , showed that the effects of CyPGs on gene expression in T cells were independent of PPAR $\gamma$  activation. These actions take place mainly through the inhibition of NF- $\kappa$ B and NFAT dependent transcription. Our results show an essential role of the inhibitory actions of 15d-PGJ<sub>2</sub> and  $\text{PGA}_1$  on NFAT activity, through a direct interaction of the CyGs with this transcription factor.

Together, these results provide new evidences about the immunomodulatory and anti-inflammatory actions of 15d-PGJ<sub>2</sub> and  $\text{PGA}_1$  in T cells as well about the mechanisms involved in these effects. In this sense, this work provide new data about the actions of CyPGs in the regulation of gene expression though their interference with NFAT activation. These studies highlight the potential of these compounds or their analogues as therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases.

Las prostaglandinas (PGs) son mediadores lipídicos importantes en el proceso inflamatorio y en el mantenimiento de la homeostasis celular y tisular, regulando diversos procesos fisiopatológicos. Las PGs ciclopentenonas (CyPGs) incluyen a la  $\text{PGA}_1$  y a la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ - $\text{PGJ}_2$  (15d-PGJ<sub>2</sub>), que se forman por deshidratación de  $\text{PGE}_1$  y  $\text{PGD}_2$  respectivamente. Las CyPGs presentan propiedades anti-inflamatorias, anti-tumorales y anti-virales, y pueden actuar a través del Receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR)- $\gamma$ , así como mediante la modificación covalente de residuos de cisteínas en proteínas celulares, modificando su función.

Esta tesis doctoral se centra en el estudio de las acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y la  $\text{PGA}_1$  en el proceso de activación de los linfocitos T humanos, a través del estudio de sus efectos sobre parámetros tales como: proliferación y viabilidad celular, migración y regulación de la expresión génica. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto, en general, un efecto negativo de las CyPGs sobre el proceso de activación de los linfocitos T. Así, estas CyPGs promueven una disminución en la proliferación, más evidente en el caso de la 15d-PGJ<sub>2</sub>. También regulan de forma negativa la migración de linfocitos T en respuesta a la quimioquina SDF-1 $\alpha$ , con una reducción en la capacidad de polimerización de filamentos de Actina. Destaca la capacidad de las CyPGs para interferir de forma selectiva con la expresión génica en linfocitos T. De tal manera, en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> o de  $\text{PGA}_1$  se altera el patrón de expresión de un buen número de genes importantes para la fisiología de este tipo celular, tanto en estado basal como tras la activación. Observamos que se produce una reducción sustancial de la inducción de los niveles de genes esenciales en la respuesta inmune y en el proceso inflamatorio tales como IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o COX-2, entre otros. El uso de análogos estructurales y funcionales de CyPGs como la 2-Ciclopenten-1ona o el CAY10410, que difieren en su reactividad a grupos tioles y su capacidad para activar a PPAR $\gamma$ , pone de manifiesto que las acciones de las CyPGs sobre la expresión génica en células T son independientes de unión a PPAR $\gamma$ , y debidas a la inhibición de la actividad transcripcional mediada por los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y NFAT. Nuestros resultados muestran un papel esencial de las acciones inhibitoras de estos compuestos sobre la actividad de NFAT, debidas a una interacción directa con el mismo.

En conjunto, estos resultados aportan nuevas evidencias acerca de las acciones inmunomoduladoras y anti-inflamatorias de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y la  $\text{PGA}_1$  en linfocitos T, así como de los mecanismos implicados. En este sentido, este trabajo proporciona nuevos datos acerca de las acciones de las CyPGs en la regulación de la expresión génica, a través de su interferencia con la activación del factor de transcripción NFAT. Estos estudios ponen de relieve la potencial utilidad de estos compuestos o de sus análogos estructurales, en el tratamiento de enfermedades de etiología inflamatoria.

# ÍNDICE

---



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. Biosíntesis de prostanoïdes</b>	<b>7</b>
1.1. Prostaglandinas serie 2	7
1.2. Prostaglandinas serie 1	9
<b>2. Prostaglandinas Ciclopentenonas</b>	<b>10</b>
<b>3. Acciones de las CyPGs</b>	<b>11</b>
3.1. Acciones anti-virales	11
3.2. Acciones anti-proliferativas	11
3.1. Acciones anti-inflamatorias	13
<b>4. Mecanismos de acción de las CyPGs</b>	<b>15</b>
4.1. Acciones dependientes de PPAR $\gamma$	15
4.2. Acciones independientes de PPAR $\gamma$	17
<b>5. Linfocitos y CyPGs</b>	<b>19</b>
5.1. Activación del linfocito T	19
5.2. Factores de transcripción activados en linfocitos T	20
5.3. Acciones de las CyPGs en linfocitos T	24
5.4. CyPGs y factores de transcripción	25
<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>1. Materiales</b>	<b>33</b>
1.1. Líneas celulares	33
1.2. Cultivos primarios	33
1.3. Reactivos	34
1.4. Anticuerpos	36
1.5. Sondas para RT-PCR cuantitativa	37
1.6. Oligonucleótidos para RT-PCR convencional	37
1.7. Oligonucleótidos para EMSA	37
1.8. Plásmidos	38
<b>2. Métodos</b>	<b>39</b>
2.1. Obtención y análisis de ARN	39
2.2. Inmunodetección de proteínas mediante <i>Western blot</i>	40
2.3. Obtención de extractos nucleares y citosólicos	41
2.4. Ensayos de inmunoprecipitación	41
2.5. Purificación y detección de proteínas biotiniladas	42
2.6. Medida de la producción de citoquinas ( <i>ELISA</i> )	42
2.7. Medida de la actividad Calcineurina	43
2.8. Transfección transitoria y medida de la actividad luciferasa	43
2.9. Inmunofluorescencia	43
2.10. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	44
2.11. Ensayo de migración celular <i>in vitro</i>	45
2.12. Ensayo de polimerización de Actina	45
2.13. Medida de la movilización de calcio celular	45

2.14. Tinción de proteínas con anticuerpos acoplados a fluoróforos	46
2.15. Medida de especies reactivas de oxígeno (ROS)	46
2.16. Estudio de la viabilidad celular	47
2.17. Determinación del porcentaje de núcleos hipodiploides	47
2.18. Análisis estadístico	47

## RESULTADOS

<b>1. Acciones de las CyPGs sobre la activación de linfocitos T</b>	<b>51</b>
1.1. Efecto de las CyPGs sobre la expresión de CD69 y CD71 en linfocitos T	51
1.2. Efecto diferencial de la 15d-PGJ <sub>2</sub> sobre la inducción de muerte celular	53
1.3. Las CyPGs reducen la migración de linfocitos T	56
<b>2. Acciones de las CyPGs sobre la expresión génica</b>	<b>61</b>
2.1. Acciones de la PGA <sub>1</sub> sobre la expresión génica en células Jurkat	64
2.2. Acciones de la 15d-PGJ <sub>2</sub> sobre la expresión génica en células Jurkat	66
2.3. Acciones de las CyPGs sobre la expresión génica en linfocitos T	69
2.4. Acciones de las CyPGs sobre la regulación de la activación transcripcional	71
2.4.1. Efectos de la PGA <sub>1</sub> sobre la actividad transcripcional	71
2.4.2. Efectos de la 15d-PGJ <sub>2</sub> sobre la actividad transcripcional	72
2.5. Acciones de las CyPGs sobre la activación de factores de transcripción	74
2.5.1. Acciones de las CyPGs sobre la activación de AP-1	74
2.5.2. Acciones de las CyPGs sobre la activación de NF-κB	76
2.5.3. Acciones de las CyPGs sobre la activación de NFAT	78



<b>3. Mecanismo de acción de las CyPGs sobre la activación de NFAT</b>	<b>79</b>
3.1. Acciones de las CyPGs sobre la desfosforilación de NFAT	80
3.2. Efecto de las CyPGs sobre la translocación al núcleo de NFAT	82
3.3. Efecto de las CyPGs sobre la unión de NFAT al ADN	84
3.4. Estudio de la interacción de las CyPGs con NFAT <i>in vivo</i>	85
3.5. Estudio del mecanismo de inhibición de NFAT <i>in vitro</i>	87
<b>DISCUSIÓN</b>	
<b>1. Las CyPGs inhiben la proliferación de las células T</b>	<b>93</b>
<b>2. Las CyPGs inhiben la migración de los linfocitos T inducida por SDF-1<math>\alpha</math></b>	<b>95</b>
<b>3. Acciones de las CyPGs sobre la expresión génica</b>	<b>98</b>
<b>4. Las CyPGs inhiben la transcripción mediada por NFAT por mecanismos independientes de PPAR<math>\gamma</math></b>	<b>100</b>
<b>5. Relevancia fisiopatológica de las acciones de las CyPGs</b>	<b>102</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>111</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b>	<b>131</b>

## ABREVIATURAS

---



<b>15d-PGJ<sub>2</sub></b>	15 desoxi prostaglandina $\Delta^{12,14}$ -J <sub>2</sub>
<b>18s</b>	Subunidad 18s de ARN ribosómico
<b>2-Ciclop</b>	2-Ciclopenten-1-ona
<b>7AAD</b>	7-Aminoactinomicina-D
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AINE</b>	Anti-inflamatorios no esteroideos
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígenos
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNi</b>	Ácido ribonucleico de interferencia
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>BCA</b>	Ácido bicincónico
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclinas
<b>CK1</b>	Caseína quinasa-1
<b>CnA</b>	Calcineurina
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>cPGES</b>	Sintasa de la prostaglandina E <sub>2</sub> citosólica
<b>CRAC</b>	Canal liberador de calcio activado por calcio
<b>CRTH2 (DP2)</b>	Receptor quimiotáctico de PGD <sub>2</sub> expresado en células Th2
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CyPG</b>	Prostaglandina ciclopentenona
<b>cys</b>	Cisteína
<b>DAG</b>	Diacylglicerol
<b>DAPI</b>	4,6 Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
<b>DCFDA</b>	2',7'-Diclorofluoresceína diacetato
<b>DGLA</b>	Ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico
<b>DMEM</b>	Medio <i>Dulbecco's modified Eagle's</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DP</b>	Receptor de PGD <sub>2</sub>
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>DYRK</b>	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etildiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol tetraacético
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>EMSA</b>	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
<b>EP</b>	Receptor de PGE <sub>2</sub>
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares

<b>FCS</b>	Suero de ternera fetal
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FP</b>	Receptor de $\text{PGF}_{2\alpha}$
<b>FXR</b>	<i>Farsenoid X receptors</i>
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GCL</b>	Glutamato cisteína ligasa
<b>GLA</b>	Ácido $\gamma$ -linolénico
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteínas G
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GSK</b>	Glucógeno sintasa quinasa
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HBSS</b>	Solución equilibrada en sales de Hank
<b>HO-1</b>	Hemooxigenasa 1
<b>H-PGDS</b>	Sintasa de la prostaglandina $\text{D}_2$ hematopoyética
<b>HSF</b>	Factor de choque térmico
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IKK</b>	Quinasa de I $\kappa$ B
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>iNOS</b>	Sintasa inducible del óxido nítrico
<b>Ion</b>	Ionóforo A23187
<b>IP</b>	Receptor de prostaciclina
<b><math>\text{IP}_3</math></b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>ITAM</b>	Motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	Proteína inhibidora de $\kappa$ B
<b>JNK</b>	Quinasa c-Jun N-terminal
<b>LAT</b>	Estabilizador de células T activadas
<b>LC</b>	Cromatografía líquida
<b>L-PGDS</b>	Sintasa de la prostaglandina $\text{D}_2$ lipocalina
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LXR</b>	<i>Liver X receptor</i>
<b>MALDI</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MEF2</b>	Factor potenciador de miocitos-2
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>mPGES</b>	Sintasa de la prostaglandina $\text{E}_2$ microsomal
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	par de bases
<b>PBLs</b>	Linfocitos de sangre periférica
<b>PBMC</b>	Célula mononuclear de sangre periférica

<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PGFS</b>	Sintasa de la prostaglandina F <sub>2α</sub>
<b>PGIS</b>	Sintasa de la prostaciclina
<b>PHA</b>	Fitoheماغلوتinina
<b>PI3K</b>	Fosfatidil Inositol-3 quinasa
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>PK</b>	Proteína quinasa
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PPAR</b>	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
<b>PPRE</b>	Elemento de respuesta de PPAR
<b>PTEN</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa
<b>RAR</b>	Receptor del ácido retinoico
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RCAN</b>	Regulador de calcineurina
<b>RLU</b>	Unidad relativa de luciferasa
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPMI</b>	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>RXR</b>	Receptor del ácido 9-cis retinoico
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SDF-1α</b>	<i>Stromal derived factor-1α</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>STAT</b>	Factor transductor de señales y activador de la transcripción
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TLR</b>	Receptor tipo toll
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo
<b>TP</b>	Receptor de tromboxano
<b>TPA</b>	Éster de forbol 12-miristato 13-acetato
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral
<b>TRITC</b>	Isotiocianato de tetrametilrodamina
<b>TxA<sub>2</sub></b>	Tromboxano
<b>TxS</b>	Sintasa de tromboxano
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>ZAP70</b>	<i>Zeta-chain-associated protein kinase of 70 KDa</i>



# INTRODUCCIÓN

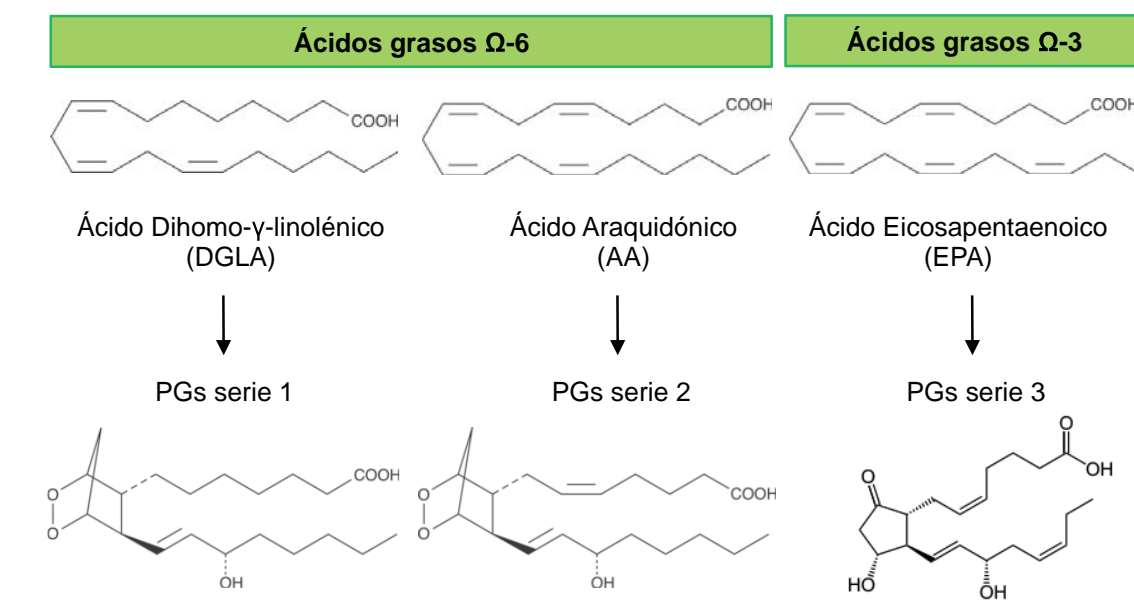
---





## 1. BIOSÍNTESIS DE PROSTANOIDES

Los prostanoideos son mediadores lipídicos, producto de una serie de reacciones enzimáticas que tienen como precursor un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos. En dichas reacciones participan de forma secuencial las ciclooxygenasas (COXs) y diversas sintasas específicas de las diferentes prostaglandinas (PGs) y del tromboxano (TX). Dependiendo del ácido graso de partida, diferenciamos las PGs de la serie 1, que tienen como precursor el ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), las de la serie 2, que se originan a partir del ácido araquidónico (AA) y las PGs de la serie 3 que derivan del ácido eicosapentaenoico (EPA). El número de la serie hace referencia a la cantidad de dobles enlaces presentes en su estructura (Das, 2006) (Figura I1).



**Figura I1:** Ácidos grasos precursores de las diferentes series de prostaglandinas (PGs).

El interés reciente de las PGs de la serie 3 se debe a los estudios que relacionan el consumo de ácidos grasos omega-3 con efectos anti-inflamatorios, inhibiendo la agregación plaquetaria y reduciendo la hipertensión y la hiperlipidemia. La ingesta de alimentos ricos en omega-3 también se relaciona con mejoras en la resolución de trastornos mentales y en el desarrollo de tumores (Riediger et al., 2009; Russell y Bürgin-Maunders, 2012). A diferencia de las PGs de la serie 3, las series 1 y 2 proceden de ácidos grasos omega-6, DGLA y AA, respectivamente. La producción de derivados del DGLA requiere la ingesta de éste, relacionándose las dietas ricas en este ácido graso o sus precursores, con efectos anti-proliferativos y anti-inflamatorios (Wang et al., 2012). Las PGs de la serie 2 son las más abundantes en mamíferos, siendo su ruta de síntesis la más estudiada.

### 1.1. Prostaglandinas de la serie 2

Los prostanoideos de la serie 2 derivan del AA liberado a partir de fosfolípidos de membrana por la acción de la fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ). El AA sirve de sustrato para la acción de las COXs (COX-1 y COX-2) que, mediante dos reacciones que tienen lugar de forma consecutiva, lo convierten en prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ), precursora de los

diferentes prostanoïdes. Tras la primera reacción de ciclooxigenación del AA se produce la prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ) la cual, tras una reacción de peroxidación, se convierte en  $PGH_2$  (Korbecki et al., 2014).

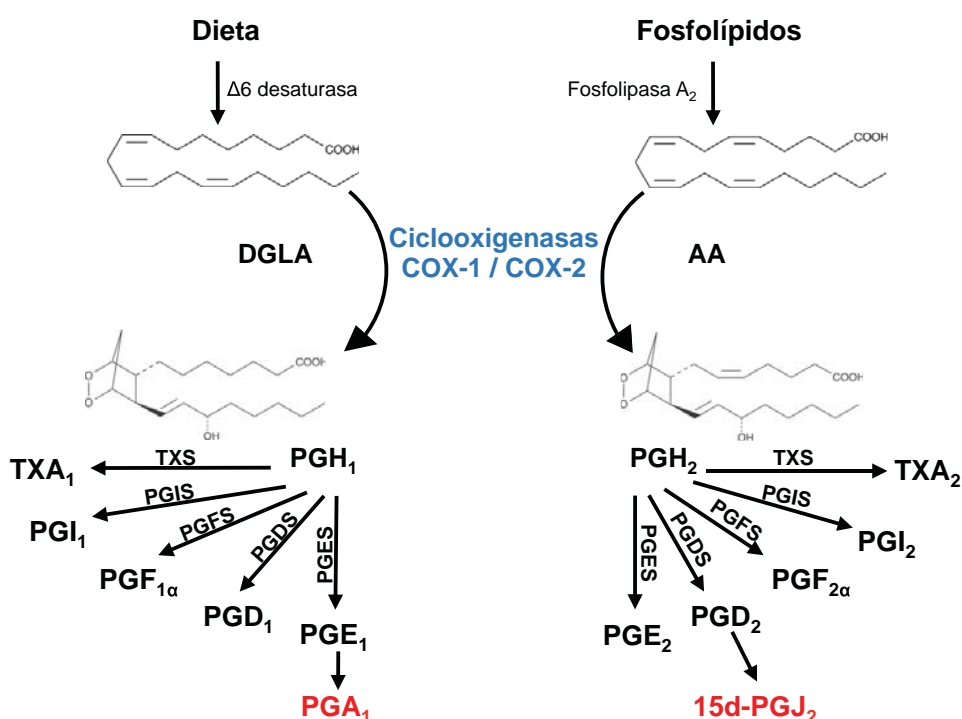
La isoforma COX-1 se considera de expresión constitutiva, siendo responsable de la regulación de funciones fisiológicas tales como la agregación plaquetaria, la protección de la mucosa gástrica o la función renal. Por su parte, COX-2 es un enzima inducible en condiciones patológicas en respuesta a la acción de citoquinas, mitógenos o estímulos inflamatorios, y es el productor principal de prostanoïdes durante el proceso inflamatorio. Si bien de forma clásica las acciones de COX-1 son responsables de la homeostasis celular y las de COX-2 de la inflamación, ambas enzimas pueden contribuir a la síntesis de prostanoïdes con funciones fisiológicas o durante la respuesta inmune (Ricciotti y FitzGerald, 2011; Smyth et al., 2009). El hecho de que la síntesis de COX-2 se incremente durante procesos inflamatorios ha centrado el interés del desarrollo de fármacos inhibidores de su actividad. Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) clásicos inhiben tanto a COX-1 como a COX-2. El desarrollo de los Coxibs, que inhiben selectivamente la acción de COX-2, buscaba paliar el daño gástrico y cardiovascular producido por los AINEs tradicionales a consecuencia de la inhibición de COX-1. Sin embargo, el uso de estos compuestos se ha relacionado con episodios de daño cardiovascular (Anwar et al.; Baron et al., 2008).

El intermediario en la síntesis de prostanoïdes,  $PGH_2$ , es sustrato de las distintas PG-sintasas (Figura I2). Las PGE sintasas, de las que hay 3 isoformas, una citosólica (cPGES) y dos microsomales (mPGES-1 y mPGES-2), son responsables de la producción de  $PGE_2$ . Se han descrito dos proteínas con capacidad para mediar la producción de  $PGD_2$ , una forma hematopoyética (H-PGDS) y otra de tipo lipocalino (L-PGDS). Por su parte, la PGFS, la PGIS y la TXS, serían las sintasas responsables de la producción de las prostaglandinas  $PGF_{2\alpha}$ , prostaciclina ( $PGI_2$ ) y tromboxano ( $TxA_2$ ), respectivamente (Ricciotti y FitzGerald, 2011).

Los prostanoïdes llevan a cabo sus acciones a través de su unión a receptores transmembrana acoplados a proteínas G (GPCRs). Estos receptores se conocen como EP-1, -2, -3 y -4 en el caso de la  $PGE_2$ , DP1 y CRTH2 o DP2 para la  $PGD_2$ , FP para la  $PGF_{2\alpha}$  e IP en el caso del receptor de la  $PGI_2$ . El  $TxA_2$  puede actuar a través de dos receptores,  $TP_\alpha$  y  $TP_\beta$ . Los efectos finales de los prostanoïdes dependen tanto del balance en su producción, de la distribución y función de los receptores en los distintos tejidos y de las rutas de señalización que activen las proteínas G a las que se asocian, entre otros factores (Korbecki et al., 2014; Ricciotti y FitzGerald, 2011; Smyth et al., 2009).

La  $PGE_2$ , en condiciones fisiológicas, regula la presión sanguínea, la integridad gastrointestinal o la fertilidad. Su aumento durante el proceso inflamatorio está relacionado con los síntomas clásicos: fiebre y dolor, si bien también puede tener funciones anti-inflamatorias dependiendo del tipo celular o los receptores implicados (Ricciotti y FitzGerald, 2011). Las principales funciones de la  $PGF_{2\alpha}$  tienen que ver con el control de la homeostasis del sistema reproductor femenino, si bien también tiene acciones a nivel

cardiovascular regulando la disfunción miocárdica y la producción de hipertrofia cardíaca (Basu, 2007; Fan et al., 2010). La  $\text{PGD}_2$ , en el sistema nervioso central, participa en la regulación del sueño. En tejidos periféricos, esta PG es sintetizada principalmente en células del sistema inmune. El uso de modelos de inflamación con ratones deficientes en H-PGDS ha puesto de manifiesto que su síntesis es necesaria para la resolución de la inflamación. Por otro lado, el aumento de sus niveles se relaciona con procesos adversos durante reacciones alérgicas (Rajakariar et al., 2007; Ricciotti y FitzGerald, 2011). Las cascadas de señalización activadas por los diferentes prostanoides pueden tener incluso funciones biológicas opuestas, como en el caso del  $\text{TXA}_2$  y la  $\text{PGI}_2$ , con acciones esenciales en la homeostasis vascular. Mientras que el  $\text{TXA}_2$  es vasoconstrictor y pro-trombótico, la  $\text{PGI}_2$  actúa como vasodilatadora e inhibe la agregación plaquetaria (Yuhki et al., 2011).



**Figura I2: Síntesis de prostanooides.** Los prostanooides de las series 1 y 2 se sintetizan a partir de DGLA (Ácido dihomo-gamma-linolénico) y AA (Ácido araquidónico), respectivamente, por acción de las ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2) acopladas a distintas PG y Tx sintasas específicas. Las CyPGs  $\text{PGA}_1$  y  $15\text{d-PGJ}_2$  se producen a partir de la deshidratación de  $\text{PGE}_1$  y  $\text{PGD}_2$ , respectivamente.

## 1.2. Prostaglandinas de la serie 1

Las PGs de la serie 1 derivan del DGLA procedente de la dieta. Los mamíferos necesitan ingerir ácido linoleico como fuente de ácidos grasos esenciales. Este ácido linoleico se metaboliza en GLA por acción de la  $\Delta 6$  desaturasa, y posteriormente en DGLA. Este DGLA puede convertirse en AA mediante una reacción de desaturación adicional llevada a cabo por la  $\Delta 5$  desaturasa, sin embargo, la baja actividad de esta enzima en humanos y roedores hace que el DGLA sólo se convierta parcialmente en AA (Wang et

al., 2012). El DGLA es sustrato para la acción de las COX, productoras del intermediario inestable  $\text{PGH}_1$  que utilizan las distintas PG sintasas para producir  $\text{PGE}_1$ ,  $\text{PGD}_1$ ,  $\text{PGF}_{1\alpha}$ ,  $\text{PGI}_1$  y  $\text{TXA}_1$  (Figura I2).

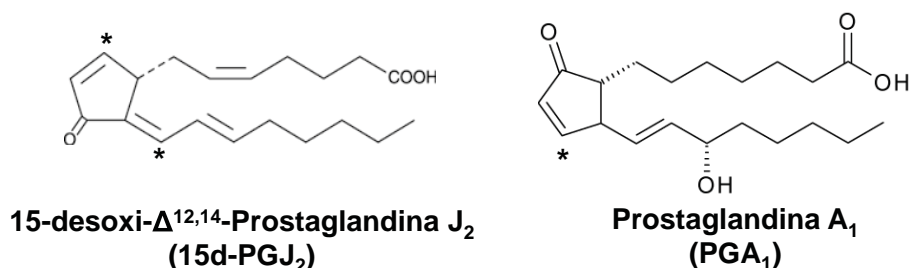
Al igual que las PGs de la serie 2, estos compuestos llevan a cabo sus acciones a través de la unión a GPCRs (EP, DP, FP, IP y TP). Se ha descrito que  $\text{PGE}_1$ , si bien se une preferentemente a receptores EP, también puede unirse a los IP, incluso con mayor afinidad (Takahashi et al., 2005).

## 2. PROSTAGLANDINAS CICLOPENTENONAS

Algunas PGs pueden llevar a cabo sus efectos, además de mediante su unión a GPCRs, a través de su conversión en otros metabolitos. Así, la deshidratación de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGE}_1$  y  $\text{PGD}_2$ , da lugar a las denominadas prostaglandinas ciclopentenonas (CyPGs)  $\text{PGA}_2$ ,  $\text{PGA}_1$  y  $15\text{d-PGJ}_2$ , respectivamente. Las CyPGs se caracterizan por la presencia de un anillo ciclopentenona en su estructura que contiene un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado, a través del cual reaccionan con distintas proteínas celulares, dando lugar a efectos anti-inflamatorios, anti-proliferativos y anti-virales (Straus y Glass, 2001). En esta tesis doctoral se analizan las acciones de algunos de estos compuestos como la  $15\text{d-PGJ}_2$  y la  $\text{PGA}_1$  (Figura I3).

### 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub>

La 15 desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> ( $15\text{d-PGJ}_2$ ) es la CyPG más estudiada. Fue descrita por primera vez en 1983 por Fitzpatrick y Wynalda (Fitzpatrick y Wynalda, 1983). Se produce a partir de la deshidratación de la PGJ<sub>2</sub>, metabolito deshidratado a su vez de la PGD<sub>2</sub>. A pesar de que esta CyPG puede unirse a receptores DP (Herlong y Scott, 2006; Scher y Pillinger, 2009), sus acciones se llevarían a cabo principalmente dentro de la célula, a través de su unión a receptores nucleares como el PPAR $\gamma$  (Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas  $\gamma$ ) o modificando proteínas celulares de forma covalente a través de dos grupos carbonilos electrófilos: uno situado en el anillo ciclopentenona y otro localizado en una de las cadenas laterales (Figura I3).



**Figura I3: Estructura de las CyPGs.** Los asteriscos (\*) señalan los carbonos electrófilos de las moléculas.

La  $\text{PGA}_1$  se forma a partir de la deshidratación de la  $\text{PGE}_1$ . A diferencia de la  $15\text{d-PGJ}_2$  sólo contiene el grupo carbonilo electrófilo del anillo ciclopentenona (Figura I3). Aunque se ha descrito que esta CyPG puede ejercer algunas de sus acciones a través de su unión a miembros de la familia de receptores transmembrana de prostanoïdes con baja afinidad (Hubich y Sholukh, 2006; Straus y Glass, 2001), al igual que la  $15\text{d-PGJ}_2$ , lleva a cabo sus efectos mayoritariamente por interacciones con proteínas celulares.

### 3. ACCIONES DE LAS CyPGs

Las diferentes acciones biológicas de las CyPGs comprenden efectos anti-virales, anti-proliferativos y anti-inflamatorios. Los mecanismos implicados en dichas acciones incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la unión al receptor nuclear PPAR $\gamma$  o modificaciones covalentes de proteínas a través del grupo carbonilo del anillo ciclopentenona (Straus y Glass, 2001).

#### 3.1. Acciones anti-virales

Las CyPGs, especialmente la  $\text{PGA}_1$ , interfieren a distintos niveles con la replicación tanto de virus ARN como ADN y promueven la síntesis de moléculas cito-protectoras en la célula hospedadora (Santoro, 1997). Sus efectos anti-virales dependen de la presencia del anillo ciclopentenona, a dosis que no interfieren con la síntesis de proteínas celulares, siendo efectiva incluso en estadios relativamente tardíos de la replicación del virus.

Estas acciones anti-virales pueden resumirse en aquellas debidas a la interferencia con la transcripción mediada por NF- $\kappa\text{B}$  (Factor Nuclear  $\kappa\text{B}$ ), necesaria para la expresión de genes víricos (Amici et al., 2004; Amici et al., 2006). La inhibición de la actividad de este factor de transcripción también se ha observado en presencia de otros agonistas de PPAR $\gamma$  (Hayes et al., 2002). Por otro lado, se han descrito acciones anti-virales asociadas a un incremento en la síntesis de la chaperona HSP-70, que interfiere con el ensamblaje del virus al asociarse con proteínas virales o inhibe la replicación vírica por competencia por la maquinaria de replicación del huésped (Amici y Santoro, 1991; Hirayama et al., 2006; Yamamoto et al., 1989).

#### 3.2. Acciones anti-proliferativas

Las PGs, especialmente  $\text{PGE}_2$ , se han considerado tradicionalmente como estimuladoras de la proliferación, debido a que se ha detectado un incremento de ésta en distintos tumores y se ha relacionado, junto con altos niveles de COX-2, con proliferación celular, angiogénesis y metástasis (Chang et al., 2004; Wang y Dubois, 2010). Los AINEs reducen la incidencia de cáncer, incluyendo los de mayor frecuencia -mama, colon, pulmón y próstata-. Estos beneficios se han relacionado con la inhibición de COX-2, y por tanto, su uso está limitado por el riesgo cardiovascular asociado (Cuzick et al., 2009; Wang y Dubois, 2010). El descubrimiento de los efectos anti-proliferativos de las CyPGs, mayores que los producidos por sus precursores y por tanto independientes de receptores transmembrana (Fukushima et al., 1982; Honn y Marnett, 1985), hizo que se les considerara como agentes

anti-neoplásicos. Sus acciones sobre la proliferación celular se deben tanto a la inhibición de la progresión del ciclo celular como a la inducción de apoptosis.

La mayoría de sus efectos anti-proliferativos se deben a sus acciones sobre la progresión a lo largo del ciclo celular de células tumorales. Estos efectos tienen su origen en alteraciones de la expresión génica que incluyen genes implicados en la regulación del ciclo celular como p21 o p27, inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y por tanto inductores de la parada del ciclo celular. Las CyPGs incrementan los niveles de p21 y p27 a través de la inducción de su expresión o la inhibición de su degradación (Han et al., 2004; Munoz et al., 2008; Tanikawa et al., 1998). Las CyPGs también incrementan la expresión del gen supresor de tumores PTEN (Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa) que inhibe la ruta de señalización AKT/PKB reduciendo la migración celular y la progresión a lo largo del ciclo (Patel et al., 2001).

Las CyPGs reducen la expresión de otras proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular. Éste es el caso de las Ciclinas D1, D2 (Qin et al., 2003) o E (Tanikawa et al., 1998). También bloquean el ciclo impidiendo la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb) (Gorospe et al., 1996) o del proto-oncogen myc (Marui et al., 1991; Shimada et al., 2002). Estas acciones impiden la progresión G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M a lo largo del ciclo celular. La regulación de algunos de estos genes puede ser mediada por la unión de las CyPGs al receptor PPAR $\gamma$ . A través de esta unión promueve la degradación de algunas ciclinas (Qin et al., 2003) o incrementa la expresión de PTEN que presenta secuencias de unión a PPAR en su promotor (Patel et al., 2001).

De forma adicional a su capacidad para inhibir la proliferación celular, las CyPGs también mejorarían la prognosis tumoral a través de la reducción de la angiogénesis y la invasividad a otros tejidos. Se ha descrito que la 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibe la expresión de COX-2 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) implicados en angiogénesis, en una línea celular de cáncer de colon (Grau et al., 2004). También reduce la angiogénesis *in vivo* en un modelo de córnea de rata (Xin et al., 1999).

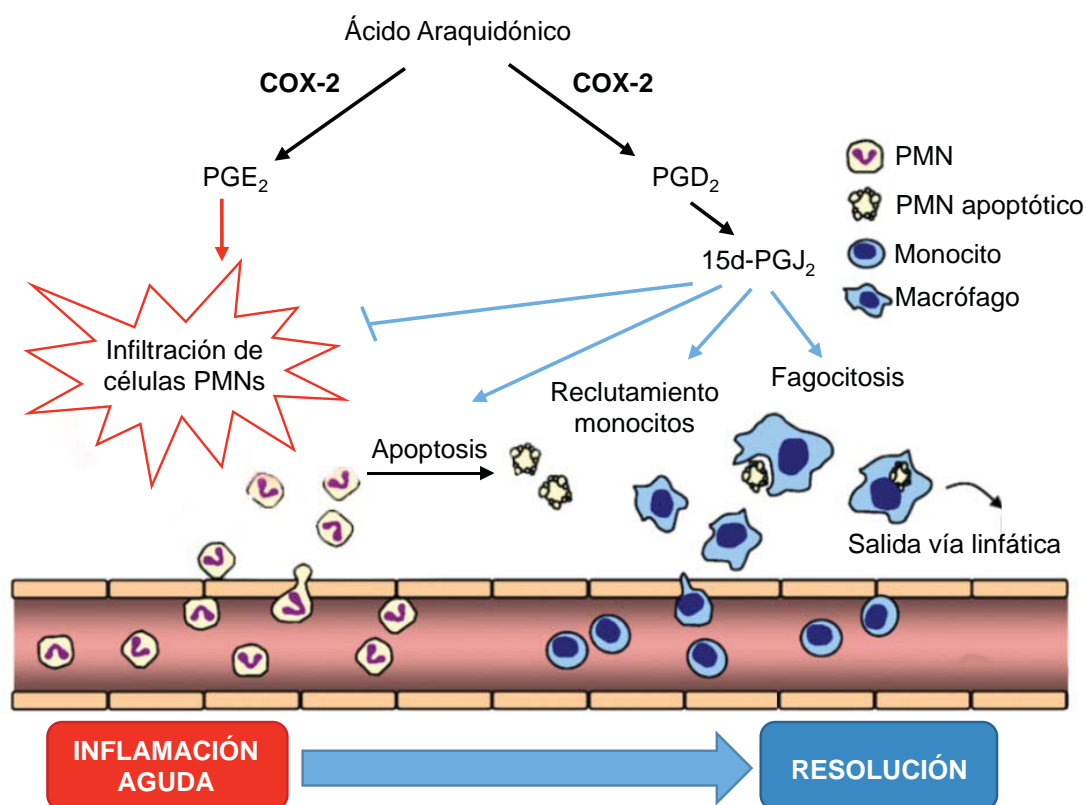
Las CyPGs inducen apoptosis en distintos tipos tumorales (Cho et al., 2006; Shin et al., 2009; Yen et al., 2014) así como en células del sistema inmune tales como macrófagos (Hortelano et al., 2000), linfocitos T (Nencioni et al., 2003) y células dendríticas (Nencioni et al., 2002) en un proceso necesario para la resolución de la inflamación. Las CyPGs pueden inducir apoptosis dependiente o independientemente de su unión a PPAR $\gamma$ , si bien se han relacionado las acciones dependientes de la unión a su ligando con síntesis *de novo* (Na y Surh, 2003). Los mecanismos a través de los que las CyPGs inducen apoptosis incluyen la producción de ROS y la activación/inhibición de distintas rutas tales como la activación de MAPK (Proteína quinasa activada por mitógenos) (Liu et al., 2003; Yen et al., 2014). También se ha descrito que la 15d-PGJ<sub>2</sub> activa la vía mitocondrial a través del incremento de la síntesis de proteínas pro-apoptóticas como Bax (Liu et al., 2005), con la consiguiente pérdida de potencial de membrana, la liberación de citocromo-c y la activación de caspasas (Moriai et al., 2009; Nencioni et al., 2003; Shin et al., 2009). Por



otro lado, también se ha relacionado la inducción de apoptosis por parte de la dienona con la inhibición de la telomerasa reversa (hTERT) que es un marcador tumoral (Moriai et al., 2009) o la ubiquitin isopeptidasa de la vía del proteasoma (Mullally et al., 2001). De forma adicional, las CyPGs también inducirían apoptosis a través de la inhibición de la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que se encuentra activo de forma constitutiva en algunos tumores y regula la expresión de genes implicados en supervivencia celular, proliferación y angiogénesis (Gasparini et al., 2014; Piva et al., 2005).

### 3.3. Acciones anti-inflamatorias

La 15d-PGJ<sub>2</sub> se produce durante el proceso inflamatorio y se acumula intracelularmente, pudiendo llevar a cabo sus acciones también de forma paracrina tras su secreción al medio (Shibata et al., 2002). La síntesis, tanto de PGD<sub>2</sub> como de 15d-PGJ<sub>2</sub>, se incrementa durante la fase de actividad de COX-2 más avanzada en el proceso inflamatorio, coincidiendo con la resolución del mismo (Gilroy et al., 1999) (Figura I4). En este sentido, Rajakariar y colaboradores observaron en un modelo murino de peritonitis inducido por zimosán, que la ausencia de PGD<sub>2</sub> se relacionaba con un fenotipo híper-inflamatorio y que la síntesis de 15d-PGJ<sub>2</sub> se detectaba durante la fase de resolución a una concentración entre 0,5 y 5 ng/ml (Rajakariar et al., 2007).



**Figura I4: Papel de la 15d-PGJ<sub>2</sub> durante la resolución de la inflamación.** Al inicio de la inflamación aguda la actividad COX-2 se acopla a sintasas productoras de PGs pro-inflamatorias como PGE<sub>2</sub>. Durante el proceso, se produce un cambio hacia la síntesis de PGs que participan en la resolución de la misma como 15d-PGJ<sub>2</sub>, a través de diferentes mecanismos: reduciendo la infiltración de PMNs, induciendo apoptosis de PMNs residuales o promoviendo la salida de macrófagos, entre otros.



Los efectos anti-inflamatorios de las CyPGs han sido ampliamente estudiados y se relacionan con su interferencia con la actividad de factores de transcripción que regulan el proceso inflamatorio, tales como NF- $\kappa$ B, AP-1 (Proteína Activadora-1), NFAT (Factor Nuclear de células T Activadas) y STAT (Transductor de señal y Activador de la Transcripción). Trabajos previos han descrito que la unión de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, así como la de otros ligandos sintéticos, a PPAR $\gamma$  inhibe la actividad transcripcional de STAT-1, AP-1 y NF- $\kappa$ B en macrófagos activados (Ricote et al., 1998). Estas acciones inhibitorias incluyen la sumoilación de PPAR $\gamma$  y su reclutamiento a la región promotora de genes reprimidos por factores co-represores, impidiendo la degradación de los mismos tras la activación celular (Glass y Saijo, 2010; Pascual et al., 2005). Debido a que muchos de los genes que se activan durante la respuesta inmune son regulados por estos factores de transcripción, los efectos de las CyPGs sobre su expresión se deberán a la suma de sus acciones sobre los diferentes reguladores transcripcionales.

A través de su unión a PPAR $\gamma$ , las CyPGs ejercen sus efectos anti-inflamatorios en distintos tipos celulares inhibiendo la expresión de genes que se inducen durante la respuesta inmune. La 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibe la producción de interferón (IFN)- $\gamma$  e interleuquina (IL)-17, IL-2 e IL-4 en células T (Chung et al., 2003; Yang et al., 2000). Inhibe también la síntesis de IL-6, IL-12 y CCR7 en células dendríticas (Nencioni et al., 2002). Asimismo, disminuye la expresión de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), citoquinas y Gelatinasa B en respuesta a distintos estímulos en macrófagos, reduciendo así su activación (Azuma et al., 2001; Ricote et al., 1998). Además de sus acciones directas sobre células del sistema inmune, la 15d-PGJ<sub>2</sub> reduce su reclutamiento al foco inflamatorio mediante la inhibición de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión en células epiteliales (Marx et al., 2000; Pasceri et al., 2000), entre otros efectos.

La 15d-PGJ<sub>2</sub> también puede llevar a cabo sus acciones anti-inflamatorias de forma independiente de su unión a PPAR $\gamma$ . Ligandos sintéticos de PPAR $\gamma$  no inhiben la síntesis de citoquinas en linfocitos T (Li y Pauza, 2009) o en macrófagos (Thieringer et al., 2000), o bien requieren mayores dosis para llevar a cabo estos efectos a pesar de tener mayor afinidad por el receptor que la dienona (Kawahito et al., 2000; Marx et al., 2000; Ricote et al., 1998). De forma simultánea dos grupos demostraron, a través de la generación de líneas celulares embrionarias donde el gen PPAR $\gamma$  se había mutado, que PPAR $\gamma$  no participa en la diferenciación de macrófagos ni en la inhibición de citoquinas mediada por los agonistas de este receptor (Chawla et al., 2001; Moore et al., 2001). Además de sus acciones sobre la inhibición de genes, la 15d-PGJ<sub>2</sub> incrementa la expresión de la quimioquina IL-8, -que recluta neutrófilos, basófilos y células T al foco inflamatorio-, y la enzima Hemooxigenasa (HO)-1, -con efectos citoprotectores-, en linfocitos T activados (Alvarez-Maqueda et al., 2004; Harris y Phipps, 2002).

Distintos modelos animales han confirmado las acciones anti-inflamatorias de las CyPGs *in vivo*. En un modelo de artritis reumatoide en ratas, el tratamiento con 15d-PGJ<sub>2</sub> o Troglitazona a mayores dosis que la anterior, inducía apoptosis y reducía el reclutamiento de macrófagos al foco inflamatorio (Kawahito et al., 2000). En un ensayo de inflamación

aguda inducida por cristales, 15d-PGJ<sub>2</sub>, pero no el ligando sintético de PPAR $\gamma$  Rosiglitazona, inhibía la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Akahoshi et al., 2003). En un modelo de trauma, la dienona inhibía la producción de citoquinas inflamatorias, siendo este efecto revertido en presencia de un antagonista de PPAR $\gamma$  (Monroy et al., 2007). También se ha visto reducido el reclutamiento de macrófagos al foco de inflamación en un modelo de lesión hepática en ratones (Han et al., 2012). El uso de agonistas de PPAR $\gamma$  mejora la etiología de distintas enfermedades inflamatorias a través de la reducción de la producción de citoquinas inflamatorias y la inhibición del paso al núcleo de NF- $\kappa$ B, entre otros mecanismos (Chen et al., 2014; Hashimoto et al., 2003; Wang y Jiang, 2014; Xu et al., 2013). En conjunto, estos estudios sugirieron la utilidad de las CyPGs en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

#### 4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS CyPGs

Como hemos mencionado previamente, muchos de los efectos descritos pueden ser, tanto mediados por la unión de las CyPGs al receptor PPAR $\gamma$ , o independientes de esta unión. Las acciones a través de uno u otro mecanismo dependerán del tipo celular, la concentración de CyPG o el contexto fisiológico, dando lugar así a diferentes respuestas.

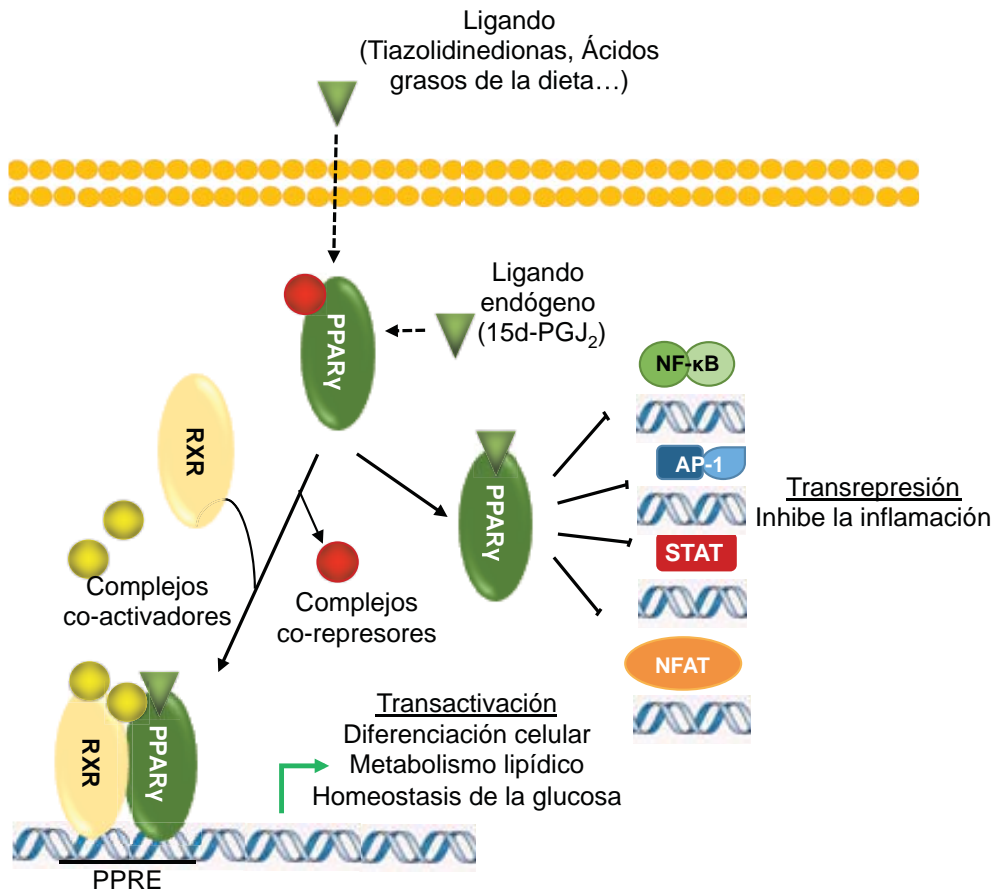
##### 4.1. Acciones dependientes de PPAR $\gamma$

Existen tres isoformas de los PPARs:  $\alpha$ -,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$ -, con diferentes patrones de expresión según los tejidos analizados, siendo la isoforma  $\gamma$ - la más ubicua. A pesar de que las tres isoformas participan en la homeostasis lipídica y la regulación de la glucosa, de forma generalizada PPAR $\alpha$  y  $\beta/\delta$  regularían procesos que implican combustión de energía como la oxidación de los ácidos grasos. Por el contrario, PPAR $\gamma$  regula procesos como la adipogénesis, la biosíntesis de lípidos y la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos, que contribuyen al almacenaje de energía (Grygiel-Górniak, 2014; Moraes et al., 2006).

Existe una gran variedad de ligandos que activan a los PPARs, entre los que se incluyen ácidos grasos y eicosanoides. Estos compuestos se unen al receptor formando aductos covalentes con la cisteína (cys) 285 (Itoh et al., 2008). En 1995 se describió que la 15d-PGJ<sub>2</sub> se une a la isoforma PPAR $\gamma$  regulando la diferenciación de los adipocitos (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995), si bien esta CyPG activa a los otros PPARs lo hace en menor medida. Además de por el ligando endógeno, este receptor se activaría también por compuestos de la familia de las tiazolidinedionas: Rosiglitazona, Ciglitazona o Pioglitazona, entre otros, que se utilizan o han utilizado como fármacos en el tratamiento de la diabetes mellitus (Grygiel-Górniak, 2014).

En la figura I5 se representan las acciones dependientes de PPAR $\gamma$ . En ausencia de ligando, los PPARs estarían unidos a factores co-represores que impedirían su actividad. Tras la unión del agonista se produce un cambio conformacional del receptor, dando lugar a la liberación de los complejos co-represores y al reclutamiento de factores co-activadores que aumentan su actividad transcripcional (Kim et al., 2013). Los PPARs forman heterodímeros junto con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR), del que también hay descritas 3

isoformas,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , con una distribución variable en los distintos tejidos. Las distintas asociaciones PPAR-RXR dan lugar a diferentes respuestas, regulando genes implicados en la diferenciación celular y en procesos metabólicos tales como la homeostasis lipídica y de la glucosa, así como en la resolución de la inflamación (Moraes et al., 2006; Straus y Glass, 2007).



**Figura I5: Esquema de las acciones de los ligandos de PPAR $\gamma$ .** Tras la unión del ligando a PPAR $\gamma$ , se liberan los complejos co-represores y se unen los co-activadores. PPAR junto al RXR se une a secuencias PPRE activando la expresión génica. En ausencia de RXR inhibe la actividad de factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT o NFAT a través del transrepresión.

La inducción de la expresión génica por parte de estos receptores nucleares se produce mediante transactivación, es decir, mediante la unión a elementos de respuesta (PPRE) presentes en la región promotora de algunos genes. Esta región está formada por 2 hexanucleótidos, con la secuencia consenso AGGTCA, separados por un nucleótido espaciador (Moraes et al., 2006). A través de este mecanismo regula la expresión de genes específicos de adipocitos (Rosen et al., 2000) y la de genes como SRI-2 (sustrato 2 del receptor de insulina) y los transportadores de glucosa GLUT2 y GLUT4, entre otros, que aumentan la sensibilidad a insulina (Kim et al., 2013).

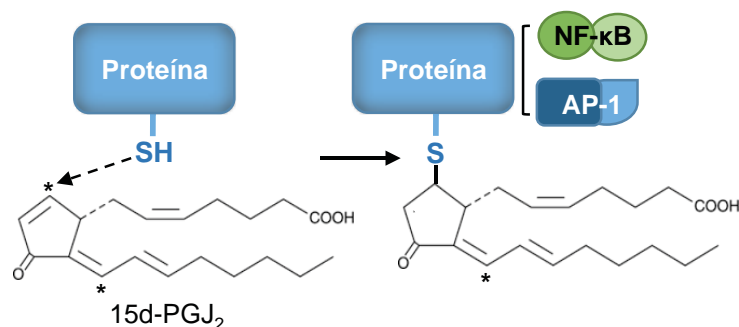
Además de la inducción de la expresión de genes con secuencias consenso en sus promotores, PPAR $\gamma$  también pueden regular la expresión génica por transrepresión, es decir, interfiriendo con la actividad de otros factores de transcripción sin unirse a secuencias en el ADN, habiéndose descrito diferentes mecanismos. Por un lado pueden afectar a la expresión de genes regulados por otros receptores nucleares tales como los RAR (receptores de ácido retinoico), LXR (*Liver X receptors*) o los FXR (*Farnesoid X receptors*) que también forman heterodímeros con el RXR, compitiendo así por el RXR disponible en la célula (Clark et al., 2000). Por otro lado, se ha descrito que PPAR $\gamma$  puede interferir con la actividad de otros factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B, AP-1 o STAT-1, a través de la competencia por complejos co-activadores limitantes en la célula (Blanquart et al., 2003; Subbaramaiah et al., 2001). Otros mecanismos descritos para la transrepresión mediada por PPAR $\gamma$  incluyen la sumoilación del receptor nuclear en la lisina 365. Esta modificación le permite asociarse al complejo de co-represores impidiendo la ubiquitinación y degradación de los mismos, manteniendo así silenciados ciertos genes cuya expresión se induce tras la activación celular y cuya transcripción es mediada por NF- $\kappa$ B, como la iNOS (Pascual et al., 2005). Se han descrito también acciones de PPAR $\gamma$  inhibiendo la transcripción mediada por NF- $\kappa$ B o NFAT a través de interacciones directas entre el factor nuclear y las subunidades p50 y p65 de NF- $\kappa$ B (Chung et al., 2000) y NFATc1 (Chung et al., 2003; Yang et al., 2000). Trabajos previos han mostrado que la unión de 15d-PGJ<sub>2</sub> a PPAR $\gamma$  inhibe la expresión de COX-2 en macrófagos y en linfocitos T, así como la expresión de IL-2 (Raman et al., 2012), IL-4 (Chung et al., 2003), IFN- $\gamma$  y Factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  (Wang et al., 2001), cuya expresión está regulada por estos factores de transcripción.

#### 4.2. Acciones independientes de PPAR $\gamma$

Además de sus efectos a través de receptores, las CyPGs pueden llevar a cabo sus acciones mediante interacciones con proteínas específicas. El abordaje experimental en dichos estudios incluye el silenciamiento de la expresión de PPAR $\gamma$  utilizando ARN de interferencia (ARNi) (Ghosh et al., 2009; Lu et al., 2013) o el uso de análogos estructurales y funcionales de las CyPGs con propiedades como ligando o no de PPAR $\gamma$  (Cippitelli et al., 2003; Fionda et al., 2007; Sanchez-Gomez et al., 2004).

Estas interacciones con proteínas específicas se deben a la presencia en el anillo ciclopentenona de un grupo reactivo electrófilo  $\alpha,\beta$ -insaturado, que les convierte en aceptores que reaccionan con grupos nucleófilos de proteínas celulares en lo que se conoce como adición de Michael (Figura I6). Además del grupo carbonilo electrófilo del anillo, la 15d-PGJ<sub>2</sub> presenta otro carbono reactivo en una de sus cadenas laterales, lo que le permite formar dos aductos simultáneamente (Pérez-Sala et al., 2003; Renedo et al., 2007). Las CyPGs interaccionan con compuestos nucleófilos como el glutatión (GSH) y cisteínas libres de proteínas celulares principalmente, si bien también se ha descrito la unión de la  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub> a la histidina 146 de la albúmina sérica humana (Yamaguchi et al., 2010). La formación de aductos con el GSH es reversible. Si bien las interacciones formadas por la PGA<sub>1</sub> son más estables que las producidas por la 15d-PGJ<sub>2</sub>, las uniones con proteínas celulares se consideran irreversibles en condiciones fisiológicas, ya que sólo

se disocian por tratamientos alcalinos (Gayarre et al., 2005; Suzuki et al., 1997).



Prostanilación (Adición de Michael)

**Figura I6: Esquema de las acciones de 15d-PGJ<sub>2</sub> independientes de PPARγ.** La 15d-PGJ<sub>2</sub> reacciona con grupos nucleófilos como sulfhidrilos libres de proteínas celulares a través de grupos carbonilos electrófilos (\*) presentes en su estructura.

El GSH es un tripéptido y el principal anti-oxidante endógeno, responsable del mantenimiento del balance redox de la célula a través de la neutralización de radicales libres y ROS. El GSH mantiene en su forma activa a los anti-oxidantes exógenos y además participa en la detoxificación de compuestos endógenos y exógenos. La síntesis de GSH se regula por distintas enzimas que incluyen la Glutamato Cisteína Ligasa (GCL), la glutatión S-transferasa (GST) o la HO-1, entre otras. Estas proteínas se regulan por elementos de respuesta frente a diferentes condiciones de estrés a los que se unen distintos factores de transcripción, tales como AP-1, Nrf-2 y NF-κB, entre otros (Lu, 2013). La formación de conjugados con el GSH es un mecanismo de eliminación de compuestos electrófilos y se lleva a cabo a través de transportadores ABC (Brechbuhl et al., 2009; Kogan et al., 2003; Mao et al., 2000). Las CyPGs incrementan la síntesis de GSH así como su eliminación a través de transportadores ABCC1, ABCC3 o ABCG2 (Brechbuhl et al., 2009; Paumi et al., 2003).

El proceso de modificación de proteínas por parte de las CyPGs es selectivo ya que no todas las cisteínas se prostanilan, tal y como demostraron Sánchez-Gómez y colaboradores al obtener distintos patrones de conjugación con la iodoacetamida, que se uniría a todas las cisteínas disponibles, y con la 15d-PGJ<sub>2</sub> (Sanchez-Gomez et al., 2004). Por otro lado, no se producen las mismas modificaciones por parte de la PGA<sub>1</sub> y de la 15d-PGJ<sub>2</sub> (Gayarre et al., 2005). Además de las variaciones en cuanto a las proteínas modificadas, pueden existir diferencias en cuanto a la cisteína prostanilada por una u otra; así Renedo y colaboradores observaron que mientras la 15d-PGJ<sub>2</sub> se une a la cys 181 y cys 184 de H-Ras, la PGA<sub>1</sub> modifica y activa a H-, N-, y K-Ras en la cys 118 (Renedo et al., 2007).

## 5. LINFOCITOS T y CyPGs

Las COXs y sus metabolitos son importantes reguladores de la respuesta inmune. La producción de eicosanoides se requiere tanto para la infiltración celular en el foco inflamatorio como para la resolución de la inflamación. Su papel en células del sistema inmune como los macrófagos está bien establecido, si bien cada vez son más los estudios que ponen de manifiesto su papel en células T, donde participan tanto en la diferenciación de los linfocitos T a las distintas subpoblaciones como en la regulación de su activación (Gilroy et al., 1999; Nicolaou et al., 2014; Rodríguez et al., 2014).

### 5.1. Activación del linfocito T

El reconocimiento por parte de las células T a través del TCR (Receptor de Células T) de antígenos adecuadamente presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de células presentadoras de antígenos (APCs), desencadena cascadas de señalización que culminan con la activación del linfocito T. En general, TCRs de células CD8<sup>+</sup> reconocen péptidos presentados en MHC-I mientras que TCRs de células CD4<sup>+</sup> lo hacen asociados al MHC-II. El TCR consta de un heterodímero compuesto por 2 cadenas  $\alpha/\beta$  que son más abundantes, o  $\gamma/\delta$  que no están MHC-restringidas y suelen ser CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, unidas por puentes disulfuro. Cada una de estas cadenas presenta un motivo variable, responsable del reconocimiento de diferentes péptidos por parte de la célula T, un dominio constante y un pequeño dominio citoplasmático. El TCR forma un complejo con el CD3, que a su vez está formado por tres dímeros invariables: dos heterodímeros  $\delta\epsilon$  y  $\gamma\epsilon$  y el homodímero  $\zeta\zeta$ . La función del CD3 dentro del complejo es la transducción de señales iniciadas por el reconocimiento antigénico por parte del TCR a través de los motivos ITAM (Motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina) presentes en sus cadenas en la región citoplasmáticas. Las células T también se pueden activar así, cuando son estimuladas con anticuerpos frente a CD3 (Dar et al., 2014; Huang et al., 2012; Kuhns et al., 2006).

Además del complejo TCR/CD3, en la superficie de las células T hay presentes otras moléculas que incluyen co-receptores, moléculas co-señalizadoras, receptores de proteínas solubles o moléculas de adhesión, entre otras, necesarias para la correcta respuesta celular. Los co-receptores CD4/8 interaccionan con el MHC y facilitan el reconocimiento antigénico, y a través de su dominio citoplasmático participan en los primeros pasos de la señalización. Las moléculas co-señalizadoras modulan la señalización mediada por el TCR (Huang et al., 2012). La participación de moléculas co-estimuladoras es necesaria para la completa activación de las células T. Así, la participación de CD28 estabiliza el ARNm de algunas citoquinas como IL-2, amplifica la activación de NFAT y NF- $\kappa$ B, previene la anergia e incrementa la supervivencia celular (Rudd et al., 2009).

Tras el reconocimiento del antígeno, el TCR activa a la tirosina quinasa LCK, que fosforila los motivos ITAM de las cadenas CD3 del complejo. Estas fosforilaciones reclutan y activan a la proteína quinasa ZAP70 (Proteína asociada a cadenas zeta de 70 KDa), que

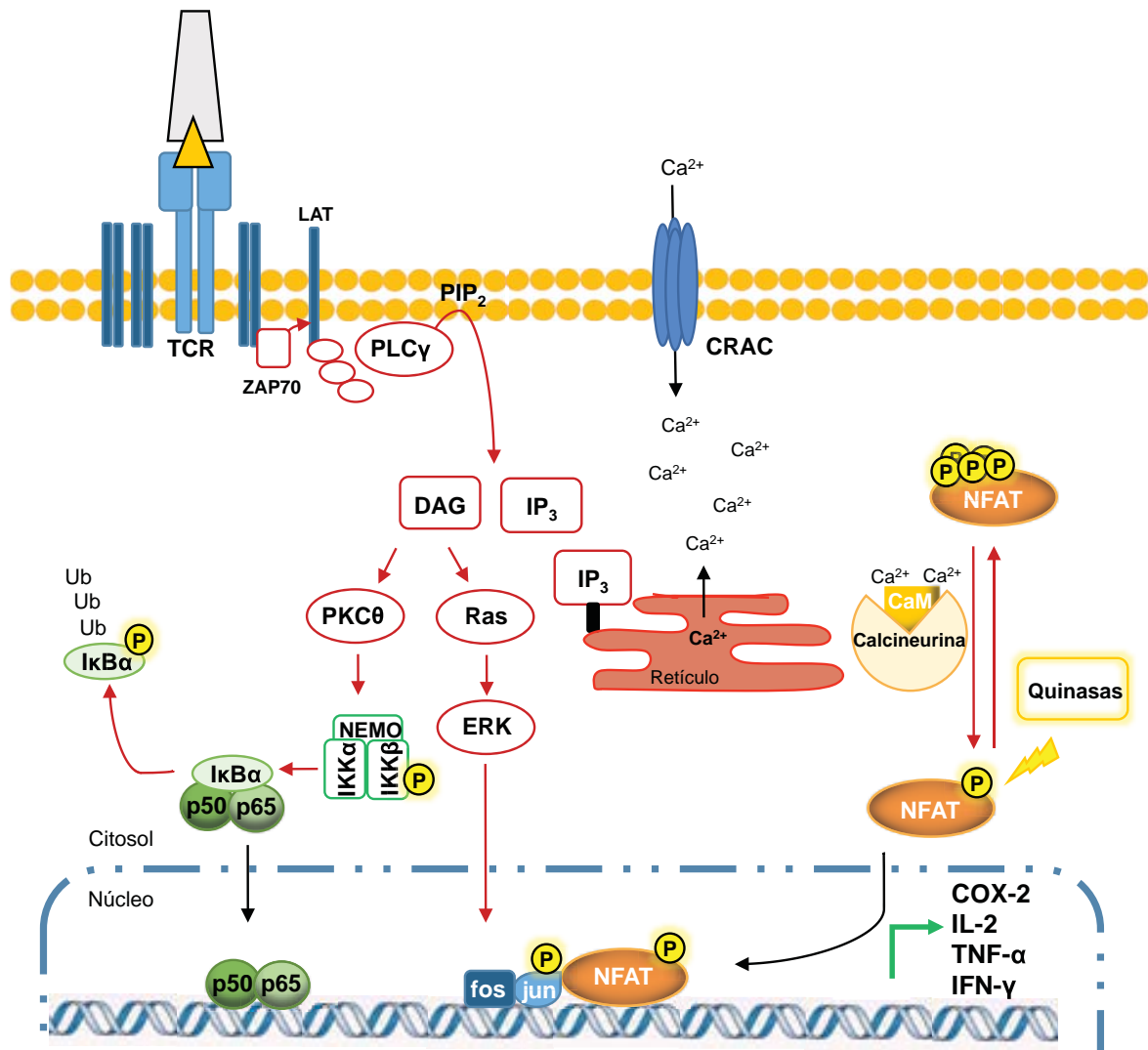


fosforila a las proteínas adaptadoras LAT (Estabilizador de células T activadas) y SLP-76, que se unen a múltiples moléculas señalizadoras entre las que se encuentra la fosfolipasa-Cy (PLC- $\gamma$ ), para formar un complejo. Este complejo señalizador activa a tres rutas principales: la señalización mediada por calcio que activa a NFAT, la activación de las MAPK que activa a AP-1 y la vía de activación de NF- $\kappa$ B. Estos tres factores de transcripción juegan un papel esencial en la regulación de la expresión génica necesaria para la proliferación de células T, su diferenciación y el desarrollo de sus funciones efectoras. Además de la activación transcripcional, también se activan rutas de señalización inductoras de cambios en el citoesqueleto y activadoras de integrinas (Brownlie y Zamoyska, 2013).

La acción de la PLC- $\gamma$  hidroliza el Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) dando lugar a dos segundos mensajeros: Inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y Diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> se une a receptores situados en la membrana del retículo endoplásmico desencadenando así liberación de calcio desde el retículo al citosol. El incremento en los niveles de calcio intracelular es reconocido por la Calmodulina, que forma complejos calcio/Calmodulina/Calcineurina responsables de la desfosforilación de NFAT y su paso al núcleo. Además de activar a NFAT, la señalización por calcio integra diferentes rutas que incluyen a quinasas dependientes de Calmodulina y la señalización mediada por Ras, entre otras (Oh-hora y Rao, 2008; Srikanth y Gwack, 2013). El DAG producto de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> catalizada por la PLC- $\gamma$ , activa dos rutas. Por un lado, al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, ya que activa a la proteína quinasa C- $\theta$  (PKC- $\theta$ ) responsable de inducir tanto la ubiquitinación de la subunidad reguladora IKK $\gamma$ , como la activación de la subunidad catalítica de IKK ( $\alpha$  o  $\beta$ ). A través de este mecanismo se produce la fosforilación del inhibidor de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) y su consecuente degradación, permitiendo la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo donde activa la expresión génica. Por otro lado, el DAG también activa la vía de señalización mediada por Ras que activa a ERK1/2 (Quinasa Regulada por señales Extracelulares) y culmina con la activación del factor de transcripción AP-1 (Brownlie y Zamoyska, 2013; Paul y Schaefer, 2013; Srikanth y Gwack, 2013).

### 5.2. Factores de transcripción activados en linfocitos T

La activación del linfocito conlleva la activación de diversos factores de transcripción entre los que se incluyen NFAT, NF- $\kappa$ B y AP-1 (Figura I7). Éstos regulan la expresión de un gran número de genes que participan en la respuesta inmune, entre los que se encuentra IL-2, que se secreta durante la fase de proliferación, otras citoquinas necesarias para la adquisición de sus propiedades efectoras o para desempeñar las mismas, tales como IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , entre otras, así como receptores de quimioquinas y enzimas como COX-2 (Hogan et al., 2003; Iniguez et al., 2000; Park et al., 2015; Wisniewska et al., 2007).



**Figura I7: Esquema de la activación del linfocito T.** Tras el reconocimiento del antígeno adecuadamente presentado por el TCR, se activan 3 cascadas de señalización que culminan con la activación de los factores de transcripción NF-κB, AP-1 y NFAT. La PLC hidroliza al  $\text{PIP}_2$  en DAG, que activa la vía de las MAPK que a su vez activa a AP-1, y promueve la ubiquitinación y degradación de IκB permitiendo el paso al núcleo de NF-κB. El aumento en la concentración de calcio promovido por el  $\text{IP}_3$  activa la vía Calcio/Calmodulina/Calcineurina responsable de la desfosforilación de NFAT y su translocación al núcleo, donde se une de manera cooperativa con otros factores de transcripción como AP-1, promoviendo la expresión génica. Mediante fosforilaciones, otras proteínas quinasas regulan negativamente la actividad de NFAT induciendo su vuelta al citoplasma.

## AP-1

AP-1 es un factor de transcripción formado por homo o heterodímeros de miembros de las familias Jun, Fos, JunD y ATF. Estímulos tales como factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores, radiación UV y activadores de células T, como el éster de forbol TPA, inducen tanto su activación como la de la ruta de las MAPK, que participan en la misma. Su regulación se produce a varios niveles. Por un lado, a través de la composición de los dímeros que lo forman, lo que dará lugar a diferentes respuestas que pueden ser incluso antagónicas, por ejemplo, mientras JunB reduce la expresión de la Ciclina D1,



c-Jun la incrementa (Shaulian, 2010). La cantidad de proteínas AP-1 disponibles se regula a nivel transcripcional por miembros de la familia de las MAPK que fosforilan y activan a factores de transcripción responsables de la síntesis de proteínas AP-1, siendo ésta también partícipe de la regulación transcripcional de c-Jun (Karin et al., 1997). Otro punto de regulación de la actividad AP-1 se produce a nivel post-traducciona l a través de fosforilaciones adicionales de ambos miembros del dímero, que son necesarias para incrementar la actividad transcripcional mediada por AP-1 (Karin, 1995).

AP-1 participa tanto en la regulación de la respuesta inflamatoria como en la supervivencia celular, variando sus efectos en función del tipo celular. Puede promover apoptosis en unos tipos celulares o supervivencia en otros. Estos efectos los lleva a cabo a través de su unión a elementos de respuesta en genes que regulan la progresión del ciclo celular, como la Ciclina D o p53, que tienen un elemento de unión que reprime su transcripción, o genes implicados en el proceso apoptótico como FasL (Shaulian y Karin, 2001).

Las acciones de AP-1 sobre la respuesta inflamatoria se deben a que también participa en la regulación de la expresión de citoquinas, quimioquinas y genes que se inducen durante el proceso inflamatorio, tales como IL-2, IL-4, IL-8, MCP-1, RANTES y COX-2, entre otros (Iniguez et al., 2000; Roebuck et al., 1999; Wisniewska et al., 2007).

### **NF-κB**

La familia NF-κB consta de cinco miembros que forman homo o heterodímeros, siendo la combinación p50:p65 la más frecuente en la mayoría de tipos celulares (Karin y Ben-Neriah, 2000). En células en reposo, NF-κB se encuentra en el citosol unido a la proteína IκB. Distintos estímulos tales como citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, infecciones víricas o bacterianas, inician una serie de señales que convergen en la activación del complejo IKK, la quinasa de la IκB. IKK fosforila a IκB marcándola para su ubiquitinación y degradación por la vía del proteosoma, dejando expuesta la secuencia de localización nuclear de NF-κB y permitiendo su paso al núcleo donde se une al ADN y junto con complejos co-activadores activa la expresión génica. La terminación de la señalización mediada por NF-κB viene a ser regulada por él mismo, ya que promueve la expresión de IκB que se une a él y lo retiene en el citosol (Verstrepen y Beyaert, 2014).

Diferentes dímeros de NF-κB regulan la expresión de distintos genes. Se ha descrito que participa en la inducción de la expresión de citoquinas que regulan la respuesta inmune tales como TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-8, moléculas de adhesión necesarias para el reclutamiento de leucocitos al foco inflamatorio y enzimas como iNOS o COX-2 cuya expresión se incrementa durante el proceso inflamatorio. Además de su papel en la regulación de la inmunidad innata, NF-κB regula la proliferación celular y la apoptosis, estando constitutivamente activo en numerosos tipos de cáncer ya que incrementa la expresión de varios genes anti-apoptóticos (Chun y Surh, 2004; Hoesel y Schmid, 2013; Ricote et al., 1998).

## NFAT

La familia de factores de transcripción NFAT se describió inicialmente en linfocitos T, si bien hoy se sabe que se encuentra en muchos otros tipos celulares. Así, además de regular la transcripción génica durante la activación de las células T, participa tanto en la regulación de procesos como la diferenciación de osteoclastos, del tejido muscular esquelético y el desarrollo cardíaco, como en procesos patológicos que incluyen el rechazo de trasplantes, la osteoporosis, la hipertrofia cardíaca y enfermedades autoinmunes (Hogan et al., 2003; Schulz y Yutzey, 2004; Sitara y Aliprantis, 2010; Wilkins y Molkenstein, 2004). Hay cinco miembros de proteínas NFAT: NFATc1 (NFAT2 o NFATc), NFATc2 (NFAT1 o NFATp), NFATc3 (NFAT4 o NFATx), NFATc4 (NFAT3) y NFAT5. Los cuatro primeros se regulan por la vía de señalización calcio/Calcineurina, mientras el último lo hace por choque osmótico.

NFAT presenta un dominio regulador rico en serinas en su región N-terminal que se encuentra hiperfosforilado, reteniéndolo en el citosol de células en reposo. Los estímulos que producen un incremento en los niveles de calcio intracelular, activan a la fosfatasa Calcineurina que desfosforila a NFAT dejando expuesta su secuencia de localización nuclear, promoviendo así su translocación al núcleo donde modula la expresión génica, ya sea de forma individual o formando complejos junto con otros factores de transcripción, variando así sus dianas génicas. AP-1 se ha descrito como su principal colaborador en la regulación de la respuesta de células inmunes (Macian et al., 2001). También regula la expresión génica junto con otros factores de transcripción como GATA, con el que participa en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo cardíaco, o MEF-2, con el que regula el desarrollo muscular (Hogan et al., 2003; Pan et al., 2013).

Cuando se interrumpe la entrada de calcio o se inhibe la actividad Calcineurina, NFAT es re-fosforilado por la acción de distintas quinasas y vuelve al citosol, cesando así su actividad. Estas quinasas, que regulan el mantenimiento en el citosol y por tanto en un estado inactivo de NFAT, así como su exportación nuclear mediada a través de CRM1, incluyen la PKA (Proteína Quinasa A) y las DYRK (*Dual Specificity Tyrosine-phosphorylation Regulated Kinase*)-1 y -2, que inician el proceso de re-fosforilación que continúan GSK-3 $\beta$  (Glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$ ) y CK1 (Caseína Quinasa-1) que participan tanto en el mantenimiento en el citosol como en la exportación. Las MAPK JNK (Quinasa c-Jun N-terminal) y p38 llevan a cabo fosforilaciones necesarias para la exportación de NFAT al citosol (Gomez del Arco et al., 2000; Pan et al., 2013). Además de los efectos inhibidores mediados por la actividad de las quinasas señaladas, otras fosforilaciones en el dominio de transactivación de NFAT llevadas a cabo por Cot, Pim1 y PKC $\zeta$  tienen efectos positivos, incrementando la transcripción mediada por NFAT (de Gregorio et al., 2001; Gómez-Casero et al., 2007; Hogan et al., 2003).

El uso de fármacos inmunosupresores como la ciclosporina A (CsA) también inhibe la activación de NFAT a través de su unión a inmunofilinas. Los complejos inmunofilina-CsA se unen a la fosfatasa Calcineurina inhibiendo su actividad (Matsuda y Koyasu, 2000). Hay otras proteínas que inhiben la actividad de la fosfatasa Calcineurina, como la familia

de proteínas RCAN (Reguladores de calcineurina). Las RCAN interaccionan directamente con la Calcineurina regulando su actividad fosfatasa, siendo ellas a su vez reguladas a nivel transcripcional por NFAT, regulando así el factor de transcripción su propia inhibición (Minami, 2014).

### 5.3. Acciones de las CyPGs en linfocitos T

Como ya se ha mencionado, tras la activación del linfocito T se ponen en marcha una serie de cascadas señalizadoras necesarias para llevar a cabo sus acciones efectoras en el foco inflamatorio junto a otros tipos celulares del sistema inmune. La terminación de la respuesta inflamatoria es un proceso necesario para evitar procesos crónicos. El incremento de la síntesis de la 15d-PGJ<sub>2</sub> durante la fase de resolución de la inflamación *in vivo*, es un proceso necesario para la terminación de la misma tal y como demostraron Rajakariar y colaboradores (Rajakariar et al., 2007). Este hecho sugiere su uso potencial como fármaco en distintas enfermedades inflamatorias. Los trabajos que analizan los efectos de las CyPGs en linfocitos T comprenden acciones anti-virales, anti-inflamatorias y anti-proliferativas, si bien el número de estudios no es tan extenso como para ser analizados en apartados independientes.

La PGA<sub>1</sub> inhibe la replicación de células T infectadas con HSV (Virus del herpes simple), la activación de NF-κB y la reactivación del VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) en estas células (Amici et al., 2004). Se ha descrito a su vez que células T infectadas con VIH e incubadas con PGA<sub>1</sub> o 15d-PGJ<sub>2</sub> presentan menos péptidos virales (Rozera et al., 1996).

Los efectos de las CyPGs sobre la función de linfocitos T en distintos modelos inflamatorios se asocian principalmente a sus acciones a través del receptor PPARγ. En este sentido se ha descrito que la 15d-PGJ<sub>2</sub> mejora la prognosis de la enfermedad en un modelo experimental de encefalomiелitis alérgica en ratones, a través de la disminución de la diferenciación de células T<sub>H1</sub>, el reclutamiento de estas células al foco inflamatorio y la reducción de la expresión de TLRs (Receptores tipo Toll) en linfocitos T infiltrados (Chearwae y Bright, 2008; Diab et al., 2002; Natarajan y Bright, 2002). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otro modelo experimental de miocarditis (Yuan et al., 2004). Tanto la 15d-PGJ<sub>2</sub> como ligandos sintéticos de PPARγ reducen la producción de citoquinas reguladoras de la respuesta inmune en células T, así como su proliferación tras la activación celular (Clark et al., 2000). Por el contrario, la 15d-PGJ<sub>2</sub> incrementa la vía MAPK/ERK, aumentando así los niveles de IL-8 secretados al medio (Harris et al., 2002). También se ha relacionado el ambiente de tolerancia inmunitaria en el intestino con la producción de 15d-PGJ<sub>2</sub> por parte de células de Kupffer, responsables de la inhibición de la activación de las células T (You et al., 2008). Esta dienona inhibe la proliferación de células Tγδ, implicadas en diferentes enfermedades autoinmunes (Li y Pauza, 2009).

Otro punto importante en cuanto a los efectos de las CyPGs sobre células T, es la inducción de apoptosis en células tumorales. En este sentido, el uso combinado de

15d-PGJ<sub>2</sub> y TRAIL (Ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral) sensibiliza a líneas tumorales resistentes a apoptosis inducida por TRAIL mediante la reducción de la expresión de AKT (Han et al., 2007). Otros autores relacionan las acciones pro-apoptóticas de la dienona en líneas celulares de linfoma T con la producción de ROS, que activarían la vía intrínseca (Chen et al., 2005; Nencioni et al., 2003). Ambos trabajos indican que la inducción de apoptosis en líneas de células T se debe a mecanismos independientes de su unión a PPAR $\gamma$ . Ligandos sintéticos de PPAR $\gamma$  también inducirían apoptosis activando la vía mitocondrial al igual que la 15d-PGJ<sub>2</sub>, si bien hay diferencias entre uno y otro en cuanto a la inducción de la expresión de genes como c-Myc, que sólo participaría en la apoptosis mediada por la CyPG (Kanunfre et al., 2004).

#### 5.4. CyPGs y factores de transcripción

Muchas de las acciones de las CyPGs sobre la expresión génica en células T se deben a la inhibición de la activación de los factores de transcripción AP-1, NF- $\kappa$ B y NFAT (Cippitelli et al., 2003; Chung et al., 2003; Yang et al., 2000).

Diferentes trabajos en distintos modelos celulares han puesto de manifiesto acciones opuestas de las CyPGs sobre miembros de la familia de proteínas AP-1, y por tanto sobre su activación. La PGA<sub>1</sub> incrementa la expresión de c-Fos a través de la activación de HSF (Factor de choque térmico). Este incremento en los niveles de c-Fos aumenta la actividad transcripcional mediada por AP-1 (Ishikawa et al., 2000) así como la unión al ADN en células vasculares de músculo liso incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub>, en las que tanto la 15d-PGJ<sub>2</sub> como ligandos sintéticos de PPAR $\gamma$  incrementan la activación de ERK (Takeda et al., 2001). En un modelo de glomerulonefritis inducida en ratas se observó que la unión de AP-1 al ADN, a diferencia de la de NF- $\kappa$ B, no se inhibía en ratas tratadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> (Panzer et al., 2002). Por el contrario, sí inhibe la unión al ADN de AP-1 y no la de NF- $\kappa$ B en células mesangiales de rata, a través de la inhibición de la activación de las quinasas JNK y ERK (Sawano et al., 2002). Las acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la unión al ADN de AP-1 a través de la inhibición de la actividad JNK, pueden ser mediadas por PPAR $\gamma$  (Ricote et al., 1998), debidas a la producción de ROS (Grau et al., 2004) o a la prostanilación de c-Jun en el dominio de unión al ADN (Pérez-Sala et al., 2003).

En cuanto a las acciones de las CyPGs sobre la activación de NF- $\kappa$ B, se han descrito diferentes mecanismos inhibidores. Trabajos previos han puesto de manifiesto que tanto la PGA<sub>1</sub> como la 15d-PGJ<sub>2</sub> inhiben la actividad de la quinasa IKK (Amici et al., 2004; Rossi et al., 2000). En este sentido, se ha demostrado que la 15d-PGJ<sub>2</sub> se une directamente a la cys 179 que se encuentra en el dominio de activación de IKK $\beta$  (Rossi et al., 2000). La PGA<sub>1</sub> incrementa la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  reduciendo así el paso al núcleo y la activación de NF- $\kappa$ B (Thomas et al., 1998). En algunos tipos celulares donde la entrada al núcleo de NF- $\kappa$ B no se ve afectada, la 15d-PGJ<sub>2</sub> actúa inhibiendo su unión al ADN ya sea modificando la cys 62 de la subunidad p50 (Cernuda-Morollón et al., 2001) o la cys 38 del monómero p65 (Straus et al., 2000). Algunas de las acciones de CyPGs que resultan en la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B ocurren de forma independiente de su unión a PPAR $\gamma$ , como la

modificación llevada a cabo por la  $PGA_1$  de  $IKK\beta$  en células T (Rossi et al., 2000). Como ya se ha mencionado anteriormente, las CyPGs también pueden actuar sobre NF- $\kappa$ B mediante su unión al receptor nuclear PPAR $\gamma$  (Straus y Glass, 2007).

Pocos trabajos relacionan las acciones de las CyPGs con la actividad de NFAT. No existen en la literatura estudios que relacionen las prostaglandinas de la serie A con este factor de transcripción, mientras que las acciones que lo relacionan con 15d-PGJ<sub>2</sub> se deben a sus efectos como ligando de PPAR $\gamma$ . En este sentido se ha descrito que esta CyPG, al igual que otros ligandos sintéticos de PPAR $\gamma$ , inhibe tanto la producción de IL-2 e IL-4, como la unión al ADN de NFAT en células T, debido a una asociación directa NFATc1-PPAR $\gamma$  (Chung et al., 2003; Yang et al., 2000). Un análogo, la 15d-PGJ<sub>2</sub> glicerol éster, inhibe, a través de su unión a PPAR $\gamma$ , tanto la producción de IL-2 como la unión al ADN de NFAT. Los autores de este trabajo relacionan la inhibición de NFAT con un incremento de los niveles de HDM2 fosforilada, una ubiquitin ligasa que media la degradación de NFAT (Yoeli-Lerner et al., 2005) y con una menor activación de NFAT debida a la inhibición de la movilización de calcio y por tanto de la actividad de la fosfatasa Calcineurina (Raman et al., 2012). Otro trabajo ha puesto de manifiesto que dosis altas de 15d-PGJ<sub>2</sub> inhiben a la proteína exportadora CRM1 mediante alquilación de la cys 528 (Hilliard et al., 2010), si bien este mecanismo no explicaría las acciones inhibitoras sobre NFAT.

## OBJETIVOS

---



Los objetivos planteados en esta tesis doctoral tienen como antecedentes diversos estudios que ponen de manifiesto las acciones anti-inflamatorias de CyPGs, como la 15d-PGJ<sub>2</sub>, en varios tipos celulares. Entre estas acciones destacan, sus efectos sobre la regulación de la expresión génica y aquéllos sobre la viabilidad y proliferación celular. Mediante dichos estudios se han establecido diferentes mecanismos de acción de estos compuestos, ya fuera a través de sus propiedades como ligandos del receptor PPAR $\gamma$  o de forma independiente de éste.

En base a estos antecedentes, los principales objetivos de esta tesis han sido:

1. Estudiar el efecto de las CyPGs 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub>, sobre diversos parámetros en el proceso de activación de linfocitos T, incluyendo proliferación y viabilidad celular, migración y expresión génica.
2. Estudiar el mecanismo por el cual estas CyPGs modulan la expresión génica en linfocitos T, analizando la existencia de mecanismos de interferencia con la actividad de factores de transcripción, con particular atención a la vía de señalización de Ca<sup>2+</sup>/Calcineurina/NFAT.





## MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. MATERIALES

### 1.1. Líneas celulares

La línea celular Jurkat, procedente de linfoma de células T humanas, se cultivó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI (RPMI 1640, Invitrogen Life Technologies) completo [2 mM L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, gentamicina (1000 U/ml), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml)] suplementado con 5% de suero fetal de ternera (FCS, BioWithaker).

La línea celular HEK293, procedente de riñón humano embrionario, se cultivó en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) completo suplementado con 5% de FCS (BioWithaker).

### 1.2. Cultivos primarios

La obtención de linfocitos humanos de sangre periférica (PBLs) se realizó a partir de muestras de sangre (*buffy coats*) de donantes sanos procedentes del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, a través de un convenio que cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación conjunto CNB-CBMSO. Tras centrifugar las células durante 35 minutos a 1800 rpm en un gradiente de Ficoll Hypaque (Amersham Biosciences), se recogió la interfase correspondiente a las células mononucleares (PBMCs). Estas células se lavaron con PBS dos veces, seguido de un lavado adicional de PBS suplementado con 5% FCS. Los eritrocitos residuales se eliminaron resuspendiendo las células en un tampón de lisis de eritrocitos [8,29 g CINH<sub>4</sub>; 1 g CO<sub>3</sub>HK; 10 ml EDTA 0,1 M (para 1 L)] durante 3 minutos en hielo. Finalmente, las células se resuspendieron en RPMI completo suplementado con 10% FCS en frascos de cultivo, a 37°C durante 2 horas, para eliminar las células adherentes. Las células en suspensión o PBLs, se cultivaron en RPMI 10% FCS a una densidad de 5x10<sup>6</sup> células/ml.

El enriquecimiento del cultivo en células T se llevó a cabo tratando los PBLs con Fitohemaglutinina (PHA, 5 µg/ml) (Sigma-Aldrich) durante 36 horas para inducir la proliferación linfocitaria. Para obtener los linfoblastos T, se añadió IL-2 (50 U/ml) (Immunotools) al medio de cultivo cada 2 días, manteniendo el cultivo entre 9 y 14 días.

## 1.3. Reactivos

Nombre	Características (Referencia)	Origen
15d-PGJ <sub>2</sub>	Ciclopentenona 15 desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J <sub>2</sub> (18570)	Cayman Chemical
15d-PGJ <sub>2</sub> -Biotina	Análogo biotinilado de la 15 desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J <sub>2</sub> (10141)	Cayman Chemical
2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (H2DCFDA)	Sonda para la detección de ROS (D399)	Thermo Scientific
2-Ciclopenten-1-ona	Análogo del anillo ciclopentenona (C112909)	Sigma-Aldrich
7-Aminoactinomicina D (7-AAD)	Reactivo para la medida de viabilidad celular (559925)	BD Pharmigen
Proteína A/G Agarosa	Ensayos de inmunoprecipitación (sc-2003)	Santa Cruz Biotechnology
<i>Absolutely RNA Miniprep Kit</i>	Kit de extracción de ARN (400800)	Agilent Technologies
Anexina V-PE	Reactivo fluorescente para medida de apoptosis celular (559763)	BD Pharmigen
BSA	Albúmina de suero bovino (A7906)	Sigma-Aldrich
<i>Calcineurin Phosphatase assay kit</i>	Kit Actividad Calcineurina in vitro (BML-AK804)	Enzo Life Sciences
CAY10410	9,10-dihidro-15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandina J <sub>2</sub> (18590)	Cayman Chemical
Ciglitazona	Ligando sintético de PPAR $\gamma$ (71730)	Cayman Chemical
Ciclosporina A (CsA)	Inhibidor de la Calcineurina (239835)	Calbiochem
Citocalasina D	Inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina (C8273)	Sigma-Aldrich
(4,6 Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) DAPI	Marcador nuclear fluorescente (268298)	Merck
DMSO	Solvente (D2650)	Sigma-Aldrich
Estreptavidina-Peroxidasa	Detección de moléculas biotiniladas (21130)	Thermo Scientific
Faloidina TRITC	Micotoxina acoplada a TRITC ( <i>Tetramethyl-Rhodamine-Iso-Thio-Cyanate</i> ) - Inmunofluorescencia (P1951)	Sigma-Aldrich
Ficoll -Paque Plus	Medio para el aislamiento de linfocitos (17-1440-03)	GE Healthcare Life Sciences
Fitohemaglutinina (PHA)	Activación y enriquecimiento de la población en células T (11249738001)	Sigma-Aldrich
Fluo-3AM	Indicador fluorescente de calcio intracelular (F1242)	Invitrogen
Fura-2	Indicador fluorescente de calcio intracelular (F1201)	Invitrogen
Glutatión reducido (GSH)	Antioxidante celular (G4251)	Sigma-Aldrich
Iodoacetamida	Agente alquilante que se une covalentemente a cys (26710)	Serva

Nombre	Características (Referencia)	Origen
IFN- $\gamma$ ELISA kit	Kit de detección de IFN- $\gamma$ (950000096)	Diaclone
IL-2	Citoquina para proliferación de linfoblastos (11340025)	Immunotools
IL-2 ELISA kit	Kit detección IL-2 (950010096)	Diaclone
Ioduro de propidio (IP)	Medida de ciclo y viabilidad celular (P4170)	Sigma-Aldrich
Ionóforo (Ion)	Ionóforo de Calcio A23187 (C7522)	Sigma-Aldrich
Lipofectamina	Reactivo de transfección (18324-012)	Invitrogen
Lipofectamina 2000	Reactivo de transfección (11668030)	Invitrogen
<i>Luciferase Cell Culture Lysis 5x Reagent</i>	Tampón de lisis comercial usado en el ensayo de actividad luciferasa (E1531)	Promega
<i>Luciferase Assay System</i>	Sustrato usado en el ensayo de actividad luciferasa (E1501)	Promega
OptiMEM	Medio de cultivo definido usado en transfección (31985047)	Invitrogen
Paraformaldehído	Solución de fijación (HT501128)	Sigma-Aldrich
PGA <sub>1</sub>	Prostaglandina A <sub>1</sub> (10010)	Cayman Chemical
PGA <sub>1</sub> -Biotina	Análogo biotinilado de la Prostaglandina A <sub>1</sub> (10013)	Cayman Chemical
Plus	Reactivo de transfección (11514-015)	Invitrogen
Proteína NFATc2	Proteína recombinante purificada del NFATc2 citosólico humano (TP313966)	OriGene
Resina de Neutravidina Agarosa	Resina para inmovilizar compuestos biotinilados (29200)	Thermo Scientific
Rosiglitazona	Ligando sintético PPAR $\gamma$ (71740)	Cayman Chemical
<i>Stromal cell derived factor 1<math>\alpha</math> (SDF-1<math>\alpha</math>)</i>	Quimioquina SDF-1 $\alpha$ / CXCL12 humana (130-096-137)	Miltenyi Biotec
<i>Super Signal West Dura Substrate</i>	Sustrato quimioluminiscente para revelado de <i>Western blots</i> (34076)	Thermo Scientific
Tampón PI + RNasa	Análisis de ciclo celular (550825)	BD Pharmigen
TNF- $\alpha$ ELISA kit	Kit de detección de TNF- $\alpha$ (950090096)	Diaclone
TPA (PMA)	Phorbol 12-myristate 13-acetate. Activador de la PKC (P-1585)	Sigma-Aldrich
Tritón X-100	Surfactante no iónico (9002-93-1)	Sigma-Aldrich
Trizol	Reactivo para aislamiento de ARN (15596-018)	Invitrogen

## 1.4. Anticuerpos

Especificidad	Referencia	Origen	Aplicación
anti-AKT	2938	Cell Signaling	WB
anti-cabra IgGs acoplado a peroxidasa	A5420	Sigma-Aldrich	WB
anti-CD28	21330280	Immunotools	CC
anti-CD3	317304	Biolegend	CC
anti-CD69-FITC	555530	BD Pharmigen	CF
anti-CD71-PE	555537	BD Pharmigen	CF
anti-conejo IgGs acoplado a peroxidasa	1858415	Pierce	WB
anti-COX-2	160112	Cayman	WB
anti-CXCR4-PE	555974	BD Pharmigen	CF
anti-ERK	sc-93	Santa Cruz Biotechnology	WB
anti-fosfo AKT	9018	Cell Signaling	WB
anti-fosfo IκBα	2859	Cell Signaling	WB
anti-fosfo JNK	sc-6254	Santa Cruz Biotechnology	WB
anti-fosfo p44/42 ERK	9101	Cell Signaling	WB
anti-HA	clon 12CA5	SMOC CBMSO (Hibridoma)	WB / IP
anti-HSP90	sc-7947	Santa Cruz Biotechnology	WB
anti-IκBα	9242	Cell Signaling	WB
anti-JNK 1/3	sc-474	Santa Cruz Biotechnology	WB
anti-NFAT 672	Anticuerpo policlonal	Dr. J. M. Redondo	WB
anti-NFATc2	sc-7296	Santa Cruz Biotechnology	WB
anti-NFATc2	sc-7295	Santa Cruz Biotechnology	IF
anti-PPARγ	101700	Cayman	WB
anti-ratón IgGs acoplado a peroxidasa	1858413	Pierce	WB
anti-ratón IgGs acoplado al fluoróforo 555	A-31570	Thermo Fischer	IF
anti-Tubulina	T6199	Sigma-Aldrich	WB
anti-β-Actina	sc-1616	Santa Cruz Biotechnology	WB

CC: Cultivo celular IF: Inmunofluorescencia IP: Inmunoprecipitación WB: Western Blot

### 1.5. Sondas Taqman para RT-PCR cuantitativa

Gen	Referencia	Origen
18s ARNr	Hs99999901-m1	Applied Biosystems
COX-2	Hs00153133-m1	Applied Biosystems
GAPDH	Hs99999905-m1	Applied Biosystems
IL-2	Hs00174114-m1	Applied Biosystems
TNF- $\alpha$	Hs00174128-m1	Applied Biosystems

### 1.6. Oligonucleótidos para RT-PCR convencional

Gen	Oligonucleótido (5'→3')
c-Fos	<i>Sense</i> : CAGACTACGAGGCGTCATCC <i>Asense</i> : AGTTGGTCTGTCTCCGCTTG
c-Jun	<i>Sense</i> : GGAAACGACCTTCTATGACGATGC <i>Asense</i> : CTCCTGCTCATCTGTCACGTTT
COX-2	<i>Sense</i> : TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT <i>Asense</i> : AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT
GAPDH	<i>Sense</i> : CCACCCATGGCAAATTCATGGCA <i>Asense</i> : ATAGAACAAGCTGACTGGCCTG
HSP-70	<i>Sense</i> : CACCACCTACTCCGACAACCA <i>Asense</i> : GCCCCTAATCTACCTCCTCAATG
IL-13	<i>Sense</i> : CCTCAATCCTCTCCTGTTGG <i>Asense</i> : TTTGGTGTCTCGGACATGC
IL-2	<i>Sense</i> : ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT <i>Asense</i> : GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC
IL-6	<i>Sense</i> : CATCCTCGACGGCATCTCAGC <i>Asense</i> : TTGGGTCAGGGGTGGTTATTG
IL-8	<i>Sense</i> : CTCTCTTGGCAGCCTTCCTGA <i>Asense</i> : CCCTCTGCACCCAGTTTTCT
PPAR $\gamma$	<i>Sense</i> : GAAATGACCATGGTTGACACAG <i>Asense</i> : CAGACACGACATTCAATTGCC
TNF- $\alpha$	<i>Sense</i> : GAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCA <i>Asense</i> : GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCCAGACT

### 1.7. Oligonucleótidos para ensayos tipo EMSA

Nombre	Secuencia (5'→3')
NFAT	<i>Sense</i> : GATCGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT <i>Asense</i> : ACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTCTCCGATC
NF- $\kappa$ B	<i>Sense</i> : AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC <i>Asense</i> : GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT



## 1.8. Plásmidos

### Plásmidos reporteros:

pCOX2-luc (p2-274): región de -170 a +104 del gen humano de COX-2 clonada en el plásmido pXP2-luc (Iniguez et al, 2000).

pIL2-luc: incluye la región de -326 a +45 del gen humano de la IL-2 clonada en el plásmido pSV2CLUcneo (Durand et al, 1988). Cedido por el Dr. G. R. Crabtree (Universidad de Stanford, Estados Unidos).

pTNF $\alpha$ -luc: región promotora del gen humano del TNF- $\alpha$  que contiene 1311 bp (Rhoades et al, 1992). Cedido por el Dr. J. S. Economou (Universidad de California, Estados Unidos).

pIL6-luc: región promotora del gen humano IL-6 que contiene 651 bp (Eickelberg et al, 1999).

pIL4-luc: región de -745 a +60 del gen murino de la IL-4 (Szabo et al, 1993). Cedido por el Dr. Roger J. Davis (Universidad de Massachusetts, Estados Unidos).

pIL13-luc: región de -940 a +48 del promotor del gen humano de la IL-13 clonada en un vector pGL2-Basic (Dolganov et al, 1996). Cedido por el Dr. J. Aramburu (Universidad Pompeu Fabra, Barcelona).

pRCAN1-luc: región de -1664 a +83 del gen humano de RCAN1 (Cano et al, 2005; Minami et al, 2004).

pPPRE-luc: contiene 3 copias de la secuencia que codifica el elemento de respuesta PPRE delante del promotor de la timidina quinasa (Forman et al., 1995).

pNFAT-luc: incluye tres copias en tándem de la secuencia correspondiente al sitio distal de unión de NFAT al promotor de IL-2 (elemento ARRE2) fusionado al promotor mínimo (-72/+47) del gen de IL-2 humano (Durand et al, 1988). Cedido por el Dr. G. R. Crabtree (Universidad de Stanford, Estados Unidos).

pNF $\kappa$ B-luc: (pNF3ConA-luc): contiene tres copias de la secuencia  $\kappa$ B consenso del promotor de la cadena  $\kappa$  de las inmunoglobulinas delante del promotor mínimo de la conalbúmina. Cedido por el Dr. F. Arenzana-Seisdedos (Instituto Pasteur, París, Francia) (Arenzana-Seisdedos et al, 1993).

pAP1-luc: contiene tres copias de la secuencia que codifica el elemento de respuesta a AP-1 de SV-40 en el plásmido pGL-2 (Sancho et al, 2004). Cedido por el Dr. Eduardo Muñoz (Universidad de Córdoba, España).

### Plásmidos de expresión:

pCDNA3: vector de clonaje para expresión de proteínas en eucariotas bajo la regulación del promotor de CMV (Invitrogen).

**pPPAR $\gamma$ :** (pCMX-mPPAR $\gamma$ ) vector de expresión que contiene el ADNc del receptor PPAR $\gamma$  (Forman et al, 1995).

**pNFATc2-HA:** plásmido de expresión de una proteína de fusión que comprende la proteína NFATc2 de ratón unida al epítipo HA (Hemaglutinina, secuencia de aminoácidos YPYDVPDYA), clonada en el vector pEF-BOS (Luo et al, 1996).

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Obtención y análisis de ARN

La extracción del ARN total de las células Jurkat se llevó a cabo utilizando *Absolutely RNA Miniprep Kit* (Agilent Technologies), mientras que el aislamiento del ARN total de las células de cultivos primarios se realizó utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen). En ambos casos se hizo de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante.

**RT-PCR convencional:** la obtención de ADNc se realizó por transcripción reversa a partir de 1-2  $\mu$ g de ARN total usando la enzima retrotranscriptasa *MuLV Reverse Transcriptase* en presencia de hexámeros aleatorios que actúan de cebadores, inhibidores de ARNasas y desoxinucleótidos trifosfato (Roche). Posteriormente, la expresión génica se determinó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*AmpliTaq DNA polimerase*, Roche), usando los oligonucleótidos cebadores específicos (Apartado 1.5). Las muestras de ADNc se amplificaron tras una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C durante 25-35 ciclos -dependiendo del gen a analizar-, consistentes en 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de anillamiento a una temperatura específica para cada cebador y 45 segundos de amplificación a 72°C. Finalmente, se realizó una elongación de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR se visualizaron mediante su separación en geles de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio 0,25  $\mu$ g/ml.

**RT-PCR cuantitativa:** para el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, se utilizó el kit *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems) para llevar a cabo la transcripción reversa, y el kit *Taqman Universal PCR Master Mix* para la amplificación posterior con sondas Taqman MGB específicas para cada gen (Apartado 1.4), en un aparato de PCR ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) en el servicio de genómica del Parque Científico de Madrid. La cuantificación de la expresión de ARNm se realizó comparando el ciclo umbral de expresión ( $\Delta\Delta C_t$ ) de las muestras con respecto al basal, siguiendo las instrucciones del fabricante (SDS 2.1 *software*, Applied Biosystems). Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se normalizaron por la expresión de los genes endógenos 18s ARNr o GAPDH. Los datos se representaron en forma de Veces de Inducción  $\pm$  SD.

**StellArray:** Analizamos 384 genes (*Human Immunology 384 StellARray*, Lonza) a partir de los cuáles seleccionamos 96 genes relacionados con la inflamación y la respuesta inmune para su estudio, utilizando un *StellArray qPCR* (Lonza), en el que ARNs obtenidos por triplicado de las distintas muestras fueron sometidos a transcripción reversa. El ADNc

obtenido fue incubado en los diferentes pocillos que contienen los oligonucleótidos para los distintos genes analizados con la mezcla *SYBR Green Master Mix* y la Taq polimerasa y sometido a PCR cuantitativa en un aparato ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) en el servicio de genómica del Parque Científico de Madrid, utilizando los siguientes parámetros: un ciclo a 50°C durante 2 minutos, un ciclo a 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, seguidos de un minuto a 60°C.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el *software* de análisis *RT<sup>2</sup>Profiler PCR Array Data Analysis 3.5* de SABiosciences. Se estableció en 35 el número de ciclos máximo a tener en cuenta en el análisis de la expresión de los distintos genes y se normalizaron respecto a la expresión de GAPDH, Actina y 18s ARNr, cuya expresión no se veía alterada por los distintos tratamientos.

## 2.2. Inmunodetección de proteínas mediante *Western blot*

Para la obtención de extractos totales de proteína, las células se sometieron a los distintos tratamientos tras los cuáles se lavaron con PBS frío y se lisaron en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% IGEPAL) con inhibidores de proteasas [leupeptina, aprotinina y pepstatina a una concentración de 10 µg/ml y 0,5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)] e inhibidores de fosfatasa s (1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> y 1 mM NaF) durante 30 minutos a 4°C. Se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 13000 rpm para eliminar el precipitado y se determinó la concentración de proteína en los sobrenadantes mediante un ensayo BCA (Ácido bicinonínico, Thermo scientific). De cada muestra se tomaron entre 5 y 40 µg de proteína, a los que se añadió tampón de carga a un volumen equivalente (2% SDS; 10% glicerol; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol).

A continuación, las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Estos geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en cámara húmeda con Tris-glicina en 20% de metanol. Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en una solución de TBS-T (20 mM Tris HCl pH 7,6; 137 mM NaCl y 0,1% Tween 20) con 5% de leche desnatada o BSA, según el anticuerpo a detectar, y se incubaron durante 18 horas a 4°C con el anticuerpo específico diluido en solución de bloqueo. Tras tres lavados con TBS-T, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico conjugado a peroxidasa, diluido en solución de bloqueo. Tras dos lavados con TBS-T y un tercero con TBS (20 mM Tris HCl pH 7,6; 137 mM NaCl), las membranas se revelaron con el reactivo quimio-luminiscente *Supersignal West Dura Extended Duration Substrate* (Pierce) para identificar las bandas de proteínas reconocidas por el anticuerpo tras su exposición a películas autorradiográficas.

Las bandas obtenidas en las autorradiografías se densitometraron, en el análisis de la activación de las quinasas, utilizando el *software* ImageJ (National Institutes of Health).

La densidad óptica (DO) de las bandas obtenidas de la forma fosforilada se normalizó respecto a la expresión de la proteína total y a la  $\beta$ -Actina en cada una de las muestras. Los resultados se muestran como porcentaje de fosforilación, siendo la muestra de referencia aquella en la que las células fueron estimuladas con SDF-1 $\alpha$  o TPA+Ion.

### 2.3. Obtención de extractos nucleares y citosólicos

Tanto los ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), como el análisis del paso al núcleo de NFATc2 mediante *Western blot*, requirieron el aislamiento de las fracciones nuclear y citosólica de células Jurkat. Para ello, las células se cultivaron en RPMI 5% FCS a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml y se incubaron con los distintos compuestos una hora antes de la activación celular con TPA+Ion. Tras 90 minutos, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en tampón A frío (10 mM HEPES pH 7,6; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA con inhibidores de proteasas y fosfatasas descritos anteriormente) durante 15 minutos. A continuación se añadió el detergente Igepal a una concentración final de 0,3% y se homogeneizaron las muestras durante 10 segundos con agitación fuerte. Posteriormente se centrifugaron a 4°C durante 30 segundos a 13000 rpm. El sobrenadante se recuperó como fracción citosólica. El precipitado se sometió a una segunda lisis en tampón A e Igepal 0,6% para eliminar posibles restos de citosol y se centrifugó de nuevo a 4°C durante 30 segundos a 13000 rpm. Tras lavar con tampón A el precipitado de núcleos obtenido, se lisó con tampón C frío (20 mM HEPES pH 7,6; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA con los inhibidores de proteasas y fosfatasas descritos anteriormente). Tras agitación fuerte durante 10 segundos, las muestras se incubaron 30 minutos a 4°C en agitación continua. La fracción nuclear se obtuvo tras la centrifugación de las muestras a 13000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. La cuantificación de proteína de los extractos nucleares se realizó mediante el método de Bradford (Bio-Rad) y la de los extractos citosólicos se determinó por BCA (Thermo scientific).

### 2.4. Ensayos de inmunoprecipitación

El análisis de la interacción entre las CyPGs y el factor de transcripción NFAT requirió la realización de ensayos de inmunoprecipitación. En dichos ensayos se utilizaron células HEK293 transfectadas con un vector de expresión de NFATc2 y cultivadas durante 48 horas antes de llevar a cabo los distintos tratamientos. Tras éstos, las células se lisaron en tampón de lisis de inmunoprecipitación (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 1% Tritón X-100, con los inhibidores de proteasas y fosfatasas antes descritos) durante 30 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 13000 rpm para eliminar el precipitado y se determinó la concentración de proteína mediante ensayo BCA (Thermo scientific). De cada muestra se tomaron entre 200 y 800  $\mu$ g -misma cantidad de proteína en todas las muestras de un mismo ensayo- que se incubaron con proteína A/G Agarosa durante una hora en agitación a 4°C. A continuación, se añadió un anticuerpo que reconoce el epítipo HA a una concentración 1/100, que se mantuvo con la proteína en agitación a 4°C durante 18 horas. Pasado ese tiempo se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 5 segundos a 4°C, tras lo cual se lavaron tres veces con

tampón de inmunoprecipitación. Como controles, de forma adicional, se incubó el extracto con proteína A/G Agarosa o con anticuerpo HA. Finalmente, las fracciones retenidas se resuspendieron en un volumen equivalente de tampón de carga, se hirvieron durante 5 minutos y analizaron mediante SDS-PAGE y *Western blot* tal y como se ha descrito anteriormente, hasta su revelado con películas autorradiográficas.

## 2.5. Purificación y detección de proteínas biotiniladas

Para la purificación de proteínas unidas a PGA<sub>1</sub> biotinilada para su posterior análisis mediante *Strep-Blot*, las células se mantuvieron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio completo sin suero durante las incubaciones con la PG biotinilada. Tras lavar las células con PBS se homogeneizaron en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 0,1 mM β-Mercaptoetanol; 1% Igepal suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa s anteriormente descritos). La concentración de proteína se determinó mediante ensayo BCA (Thermo scientific).

Las proteínas biotiniladas se purificaron por adsorción a Neutravidina-agarosa previamente equilibrada en solución de lisis con una relación peso:volumen 1:1, tras la incubación durante una hora a 4°C en agitación continua. Tras centrifugar las muestras a 2500 g durante 2 minutos en frío, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 4 veces con solución de lisis. Tras los lavados, el precipitado se resuspendió en NaOH 1 N manteniendo la relación 1:1 peso:volumen, y lo incubamos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, las proteínas unidas se eluyeron con un volumen equivalente de tampón de carga tras hervir las muestras durante 5 minutos.

Tanto los ensayos de competición, como en aquellos en los que pretendemos determinar si se unen las distintas CyPGs, se realizaron incubando una cantidad determinada de proteína con las CyPGs biotiniladas, a las concentraciones indicadas en cada apartado, durante una hora a temperatura ambiente. En los ensayos de competición se incubó la misma cantidad de proteína con los distintos competidores a temperatura ambiente durante 60 minutos antes de añadir la CyPG biotinilada. Finalmente, se añadió tampón de carga a un volumen equivalente tras lo que se analizaron los resultados mediante *Western blot*.

Estas fracciones se resolvieron mediante SDS-PAGE. Tras la transferencia, las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en una solución de PBS-Tween 0,1% BSA al 5%, seguido de una hora con Estreptavidina conjugada con peroxidasa en solución de bloqueo. A continuación, las membranas se lavaron dos veces con PBST, seguido de un último lavado en PBS, tras lo que se revelaron con mediante quimioluminiscencia y exposición a películas autorradiográficas.

## 2.6. Medida de la producción de citoquinas (ELISA)

La medida de la producción de IL-2, TNF-α e IFN-γ se llevó a cabo a partir de sobrenadantes celulares obtenidos 18 horas después de la activación celular de células Jurkat con TPA+Ion, o de células primarias tras su incubación con αCD3+αCD28 mediante



el uso de diferentes kits, siguiendo las instrucciones del proveedor (Diacclone).

## 2.7. Medida de actividad Calcineurina

La medida de la actividad Calcineurina (CnA) se llevó a cabo utilizando el kit *Calcineurin Phosphatase assay*, siguiendo las instrucciones del proveedor (Enzo Life Sciences).

## 2.8. Transfección transitoria y medida de la actividad luciferasa

Las células Jurkat se transfectaron con Lipofectamina y reactivo Plus siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen). En las transfecciones con células HEK utilizamos como reactivo de transfección la Lipofectamina 2000 (Invitrogen). En ambos casos se resuspendieron las células en medio OptiMEM (Invitrogen) a una densidad de  $10^6$  células/ml. En cada transfección se usaron, junto con los distintos reactivos de transfección, entre 0,25 y 1  $\mu$ g de plásmidos de expresión -corrigiendo con vector vacío para introducir la misma cantidad de ADN en los casos necesarios-, y 0,5  $\mu$ g de plásmido reportero en todos los ensayos luciferasa. Las células se dejaron tres (en el caso de Lipofectamina + Plus) o cuatro horas (con Lipofectamina 2000) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, tras lo cual se centrifugaron y resuspendieron en RPMI 5% FCS o DMEM 5% FCS. Las células se trataron durante una hora con las CyPGs o sus análogos y posteriormente se activaron con el tratamiento combinado TPA+Ion y se lisaron 18 horas después con 50  $\mu$ l de buffer de lisis comercial (*Luciferase Cell Culture Lysis Reagent*, Promega), tras haber sido lavadas con PBS. En los ensayos de co-transfección las células se mantuvieron durante 18 horas después de la transfección, tras lo cual se trataron con los distintos estímulos y se lisaron 6 horas después de la activación celular con TPA+Ion. Los lisados se centrifugaron para separar los restos celulares del sobrenadante, usado posteriormente en el ensayo de actividad luciferasa.

La actividad luciferasa se determinó en un luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory) tras la incubación de 20  $\mu$ l de extracto celular con el sustrato luciferina (*Luciferase Assay System*, Promega). Los valores de actividad luciferasa obtenidos se normalizaron con respecto a la cantidad total de proteína medida en los lisados celulares mediante un ensayo BCA (Thermo Scientific). Los resultados se presentan como Veces de Inducción ( $RLU_{\text{muestra}}/RLU_{\text{basal}}$ )  $\pm$  SD, o como porcentaje de Inducción, siendo 100% la luminiscencia medida tras la activación celular con TPA+Ion.

## 2.9. Inmunofluorescencia

La localización de NFATc2 en el citoplasma o núcleo celular se analizó mediante ensayos de inmunofluorescencia. Para ello, las células se trataron con las CyPGs o la CsA una hora antes de la activación celular. Pasada dicha hora, las células se depositaron sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina 50  $\mu$ g/ml durante 18 horas a 4°C, para, posteriormente dejarlas adhiriéndose 30 minutos más en el incubador de células. A continuación, las células se fijaron en paraformaldehído 2% durante 10 minutos, se lavaron tres veces con TBS pH 8,4 y se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 en PBS durante un minuto, seguido de dos lavados con PBS. Posteriormente se eliminó la autofluorescencia

con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM en PBS pH 8 durante 10 minutos. Se lavaron las células con PBS y se dejaron en solución de bloqueo (2% BSA en PBS) durante 30 minutos. Los cubreobjetos se incubaron durante una hora en cámara húmeda con los anticuerpos primarios específicos diluidos en solución de bloqueo. Tras tres lavados de PBS se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante una hora en cámara húmeda y en oscuridad. La tinción de los núcleos celulares se llevó a cabo tras tres lavados, incubando los cubreobjetos con 4,6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI, Calbiochem) durante 10 minutos en cámara húmeda y oscuridad. Para el montaje de los cubreobjetos con Mowiol (Adrich) se lavaron éstos con PBS y agua destilada. Las imágenes se adquirieron bien en el microscopio de fluorescencia invertido *Axiovert200* (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color *SPOT RT Slider* (Diagnostic), bien con el microscopio confocal Zeiss LSM710 vertical, ambos del servicio de Microscopía Óptica y Confocal del CBMSO. Para medir la intensidad de fluorescencia dentro del núcleo, las fotos, registradas a 16 bits en blanco y negro para cada canal de fluorescencia, fueron analizadas con el programa ImageJ, ajustando un umbral automático en el canal del DAPI para detectar los núcleos y generar partículas "ROI" en las que se analizó la intensidad de fluorescencia presente en el canal correspondiente a la tinción de NFAT.

## 2.10. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

**EMSA radiactivo:** La sonda correspondiente al sitio NFAT distal del promotor de la IL-2 humana de cadena doble (secuencia en Apartado 1.6), se obtuvo tras el anillado de oligonucleótidos complementarios de cadena simple a 65°C durante 10 minutos seguido de más de 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se marcó con  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATP en una reacción catalizada por la T4 polinucleótido quinasa (Fermentas) a 37°C durante 30 minutos. La sonda marcada se purificó mediante columnas de Sephadex G25 (Roche), equilibradas previamente con tampón Tris-EDTA (TE).

5  $\mu\text{g}$  de los extractos nucleares se incubaron con 1  $\mu\text{g}$  de poli dI-dC en tampón de unión al ADN (polivinil etanol 2%; glicerol 2,5%; Tris pH 8 10 mM; KCl 100 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 0,5 mM) durante 10 minutos a 4°C. En los ensayos en los que se analizó el efecto de las CyPGs sobre la unión al ADN *in vitro*, las prostaglandinas fueron incubadas con el extracto nuclear durante una hora, antes de añadir la mezcla anterior. A esta mezcla se añadieron 100000 cpm del oligonucleótido marcado con  $^{32}\text{P}$  que utilizamos como sonda y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. En los experimentos de competición se añadió a la mezcla de reacción una concentración del oligonucleótido sin marcar radiactivamente 25 veces superior a la del oligonucleótido utilizado como sonda, y se incubó en hielo durante 15 minutos antes de añadir la sonda radiactiva. Los complejos ADN-proteína se resolvieron por electroforesis en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 4%, que posteriormente fueron secados al vacío a 80°C y revelados por autorradiografía. De manera adicional, las bandas fueron cuantificadas en el bioanalizador *Phosphorimager FUJIFILM BAS 1500*. Los resultados se muestran como señal de fotoluminiscencia estimulada, corregida por la señal de fondo (PSL-bkg).

**EMSA no radiactivo:** 5 µg de los extractos nucleares se incubaron con 2 µg de poli dI-dC y 8 mM MgCl<sub>2</sub> durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la sonda NF-κB IRDye 700 (secuencia descrita en apartado 1.6) (LI-COR Biosciences). Dicha sonda se incubó durante 15 minutos en hielo y oscuridad. Los complejos ADN-proteína se resolvieron por electroforesis en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 4%. Las imágenes se adquirieron en un escáner de fluorescencia “Odyssey” (LI-COR Biosciences).

### 2.11. Ensayos de migración celular *in vitro*

Tanto las células Jurkat como los linfocitos T procedentes de donantes sanos se cultivaron durante 18 horas en medio RPMI completo suplementado con 2% FCS. Pasado este tiempo, se incubaron con los distintos compuestos ensayados a las dosis indicadas o con vehículo (DMSO) durante una hora. A continuación, entre 200000 células -ensayos con Jurkat-, y 400000 células -ensayos con linfocitos primarios-, se pasaron a placas de cultivo permeables “*transwell*” (Costar 3421, Corning Inc.) con membranas de un diámetro de poro de 5 µm para analizar la capacidad de migración de las células en respuesta a SDF-1α (50 ng/ml), dispuesto como quimioatrayente en el pocillo inferior de la placa *transwell*. La migración transcurrió durante 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se recuperaron las células migradas en el pocillo inferior de la placa. La cuantificación de las células migradas se realizó mediante conteo celular con hemocitómetro, asegurando la viabilidad de las mismas por el criterio de exclusión de azul tripán (Sigma-Aldrich). Los resultados se muestran como Migración relativa (nº de células migradas en la muestra / nº células migradas en el control), en veces de inducción con respecto a la muestra de referencia.

### 2.12. Ensayo de polimerización de Actina

La medida de Actina filamentosa (F-Actina), se llevó a cabo en células Jurkat incubadas con las CyPGs a las dosis señaladas o un volumen equivalente de DMSO durante una hora. Pasado este tiempo, se añadió al medio SDF-1α (50 ng/ml) y 3 minutos después las células se fijaron con paraformaldehído 2% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar las células con PBS, se permeabilizaron con saponina 0,3% en PBS y se marcaron con Faloidina acoplada al fluoróforo Tetrametilrodamina (TRICT) durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras tres lavados, la F-Actina polimerizada se analizó en el citómetro de flujo FACsCalibur (Becton Dickinson). Los resultados se muestran como porcentaje de F-Actina, siendo 100% el valor medido en ausencia de tratamientos. Como control, las células fueron incubadas con Citocalasina D (1 µM), un inhibidor de la polimerización de los filamentos de Actina.

### 2.13. Medida de la movilización de calcio celular

Células Jurkat, a razón de 1x10<sup>6</sup> células por condición, fueron lavadas con PBS y resuspendidas en *Hanks' Balanced Salt Solution* suplementado con 0,5% de BSA. Se incubaron con las sondas fluorescentes de unión a calcio Fluo-3AM (4 µM) y Fura Red (10 µM) durante 30 minutos a 37°C. Tras tres lavados, las células cargadas con la sonda



fueron analizadas por citometría de flujo (FACSCalibur, de Becton Dickinson) durante un minuto antes de añadir los diferentes estímulos o un volumen equivalente de DMSO y analizar un minuto, para finalmente añadir SDF-1 $\alpha$  (50 ng/ml) y medir un minuto más. Finalmente, se añadió Ionóforo de calcio A23187 (4  $\mu$ M) para establecer la máxima cantidad de calcio que podía ser movilizada. Los datos se analizaron utilizando el *software* FLOWJO y se representan como la relación de valores de fluorescencia Fluo3/Fura Red, respecto al tiempo medido en segundos.

#### 2.14. Tinción de proteínas con anticuerpos acoplados a fluoróforos

**Tinción de proteínas de membrana:** las células se sometieron a los distintos tratamientos en las condiciones indicadas en cada ensayo, tras los cuáles se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras dos lavados con PBS se incubaron con el/los anticuerpo/s marcado/s con fluorocromos detallados en el apartado 1.3, en un volumen final de 50  $\mu$ l durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Pasado este tiempo, las células se centrifugaron y se lavaron, para ser finalmente resuspendidas en PBS suplementado con 2% FCS. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) y los datos se procesaron utilizando el *software* FLOWJO.

**Tinción de proteínas totales:** el análisis de los niveles totales de CXCR4 en la célula se llevó a cabo tras los tratamientos correspondientes, tras los cuáles las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras dos lavados con PBS se incubaron con el anticuerpo frente a CXCR4, en un volumen final de 50  $\mu$ l durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación las células se lavaron y se fijaron en PBS 2% paraformaldehído durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se permeabilizaron mediante incubación en solución PBS 2% FCS 0,2% Saponina durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron y se resuspendieron con el anticuerpo marcado con fluoróforo diluido en solución de permeabilización, en un volumen final de 50  $\mu$ l, durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en solución de permeabilización tras lo cual se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) y los datos se procesaron utilizando el *software* FLOWJO.

#### 2.15. Medida de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se cultivaron las células Jurkat a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml, se lavaron, se resuspendieron en PBS atemperado y se incubaron con la sonda H2DCFDA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) (Thermo Scientific) -que difunde pasivamente al interior celular y es retenida en la célula debido a la eliminación de los grupos acetato por parte de esterasas celulares-, a una concentración final de 10  $\mu$ M, durante 45 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en oscuridad. Pasado este tiempo, se eliminó el PBS y las células se resuspendieron en RPMI 5% FCS. Se llevaron a cabo las distintas incubaciones con 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> a las concentraciones indicadas, una hora antes de estimular las células con TPA+Ion durante 3 horas.

La determinación de ROS producidas se llevó a cabo analizando su capacidad para oxidar DCFH produciendo así DCF que puede ser cuantificado dado que emite fluorescencia. Antes de analizar las células en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson), éstas se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en PBS. Los datos se procesaron utilizando el *software* FLOWJO.

## 2.16. Estudio de la viabilidad celular

Se cultivaron las células Jurkat a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml y las células primarias a  $5 \times 10^6$  células/ml en RPMI 5% o 10% FCS, respectivamente, y se llevaron a cabo los diferentes tratamientos a los tiempos indicados. A continuación, las células se centrifugaron y lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en 1 ml de tampón de unión de anexina. Seguidamente se transfirieron 100  $\mu$ l de la suspensión celular a tubos de citometría y se les añadieron 2,5  $\mu$ l de Anexina V conjugada con Ficoeritrina (Anexina V-PE) y 5  $\mu$ l del compuesto fluorescente intercalante de ADN, 7-Aminoactinomicina-D (7AAD), a los tubos correspondientes, dejándolos 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas en el FACSCalibur (Becton Dickinson) tras añadir 400  $\mu$ l de tampón de unión de anexina. Todos los reactivos utilizados se encuentran en el kit *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Pharmigen). Los datos se procesaron utilizando el *software* FLOWJO.

## 2.17. Determinación del porcentaje de núcleos hipodiploides (subG<sub>1</sub>)

Las células Jurkat y los linfocitos T primarios se cultivaron respectivamente a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml y  $5 \times 10^6$  células/ml en RPMI 5% o 10% FCS. Las células se incubaron con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> a las concentraciones indicadas durante 18 horas (Jurkat) y 96 horas (PBLs). Para ello se centrifugaron las células a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante sin alterar el pellet y se añadió etanol 70% frío poco a poco mezclando vigorosamente la solución celular. Las muestras fijadas fueron almacenadas a -20°C un mínimo de 18 horas. Pasado este tiempo las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron finalmente en tampón de ciclo *PI/RNase Staining Buffer* (BD Pharmigen) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, siendo analizadas posteriormente en el FACSCalibur (Becton Dickinson). Los datos se procesaron utilizando el *software* FLOWJO.

## 2.18. Análisis estadístico

Los datos presentados en el apartado “Resultados” están expresados como la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar (DS) de los resultados obtenidos en los diversos experimentos sobre muestras ensayadas por triplicado. Los datos han sido analizados con el *software* *GraphPad Prism Version 5.02* mediante el análisis de la varianza (*one- o two-way ANOVA*), seguido del test de Bonferroni o mediante el test de la *t de Student*. Las diferencias se consideraron significativas a partir de  $p < 0,05$ .



## RESULTADOS

---



## 1. ACCIONES DE LAS CyPGs SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T

Tras la activación celular de los linfocitos T tienen lugar una serie de cambios que culminan en la diferenciación y proliferación de éstos. En los linfocitos T activados se produce un incremento de la expresión de diversas moléculas, tales como receptores de citoquinas y quimioquinas, moléculas co-estimuladoras y de adhesión, además de diversas citoquinas y quimioquinas, entre otras (Reddy et al., 2004; Shipkova y Wieland, 2012). Estas moléculas participan de forma activa en el proceso inflamatorio y en la respuesta inmune junto con otros agentes bioactivos como los pertenecientes a la familia de los prostanoïdes. Éstos juegan un papel importante en el desarrollo del proceso inflamatorio, con efectos de diversa índole. En el inicio de la inflamación tiene lugar una primera inducción de la producción de prostanoïdes como la  $PGE_2$ , asociada a un aumento de la expresión de COX-2 y al inicio de la respuesta inflamatoria. A su vez, en una fase tardía se produce un segundo pico de inducción de prostanoïdes relacionados con CyPGs como la 15d-PGJ<sub>2</sub>, que participan en la resolución de la inflamación (Gilroy et al., 1999; Rajakariar et al., 2007). Otras CyPGs como la PGA<sub>1</sub>, procedente de la dieta, también tienen propiedades anti-inflamatorias (Straus y Glass, 2001).

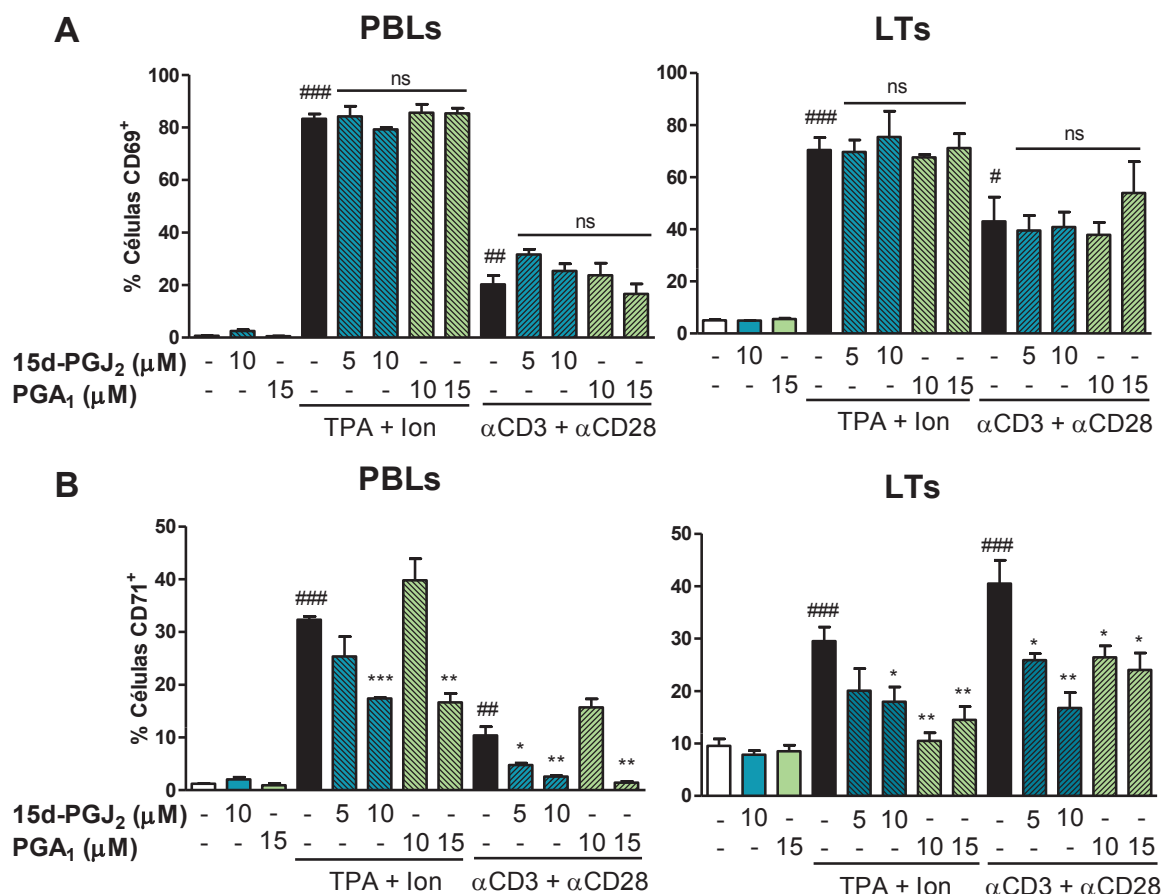
Si bien se conoce la relevancia de las acciones anti-inflamatorias de las CyPGs a nivel general, existen diversos aspectos relativos a sus efectos sobre la activación de linfocitos T que no han sido estudiados en detalle hasta la fecha y que son objeto de estudio de esta tesis doctoral.

### 1.1. Efecto de las CyPGs sobre la expresión de CD69 y CD71 en linfocitos T

La activación de las células T induce la expresión de moléculas tales como CD69 (antígeno de activación temprana) y CD71 (receptor de la transferrina) en su membrana (Shipkova y Wieland, 2012). Para determinar cómo las CyPGs afectan a la expresión de estos marcadores de la activación de los linfocitos T, se analizó la expresión de CD69 y CD71 en membrana, como marcadores de activación y proliferación, respectivamente. Estímulos como el tratamiento combinado con ésteres de forbol (TPA) junto con ionóforo de calcio (A23187, Ion), con anticuerpos agonistas anti-CD3 ( $\alpha$ CD3) y anti-CD28 ( $\alpha$ CD28) o con lectinas, inducen la expresión de estas moléculas en la superficie de los linfocitos T (Reddy et al., 2004). El efecto de 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> sobre la expresión de CD69 y CD71 en células Jurkat, PBLs o LTs, se determinó mediante citometría de flujo, tras el tratamiento con distintas concentraciones de estas CyPGs, una hora antes de la activación, bien con TPA+Ion o con  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28, durante 18 h.

Los resultados obtenidos muestran que el incremento de la expresión en membrana de CD69 que ocurre en células primarias, ya fueran PBLs o LTs, tras la activación celular inducida por los tratamientos combinados con TPA+Ion o  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28, no cambió de forma significativa en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> o de PGA<sub>1</sub> a ninguna de las dosis estudiadas (Figura 1A).

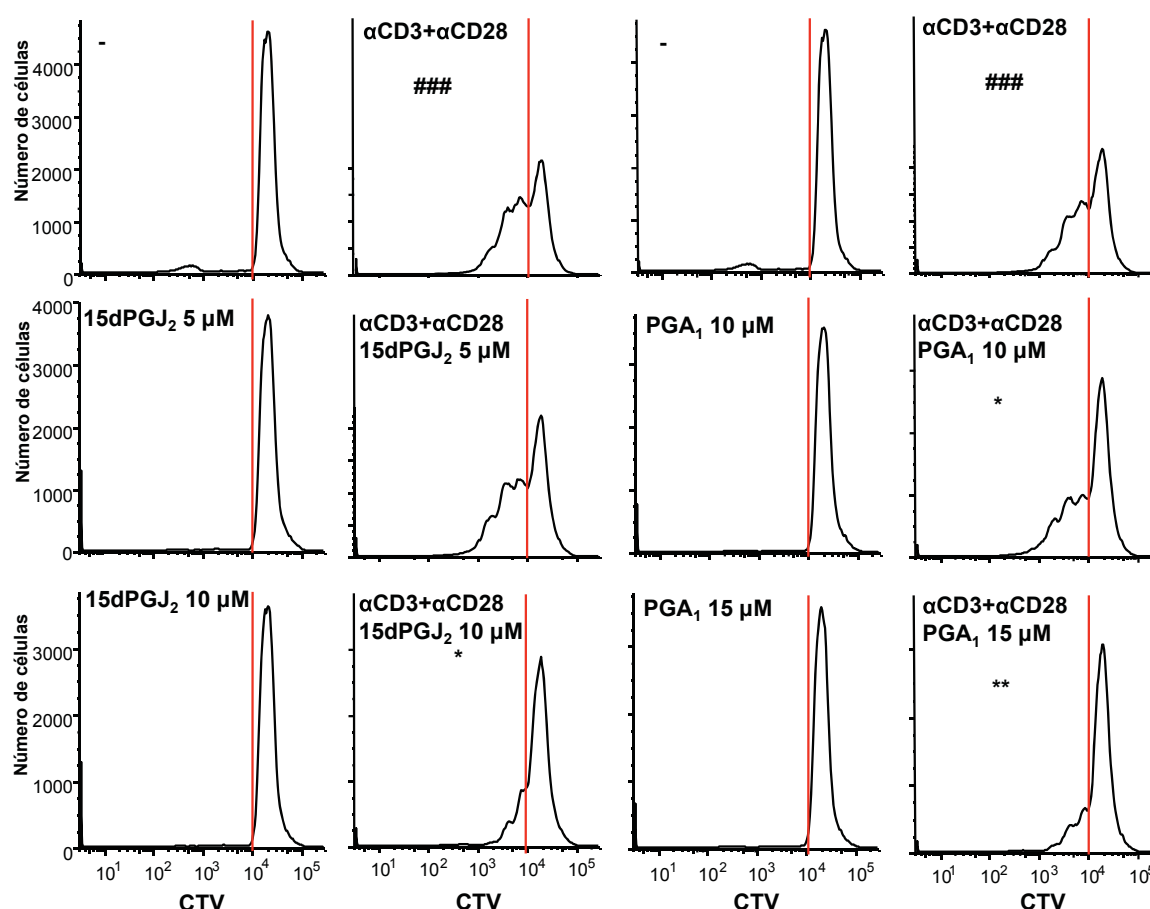
Por el contrario, el incremento en la expresión en membrana de CD71 en PBLs o LTs que tiene lugar tras la activación, disminuyó sustancialmente como consecuencia del tratamiento con estas CyPGs en ambos tipos celulares. Dado que la expresión de CD71 se relaciona con células en proliferación, la disminución de los niveles de este receptor en membrana, producida por la incubación con las CyPGs, estaría asociada con una reducción de la capacidad proliferativa de PBLs y LTs (Figura 1B).



**Figura 1: Efecto de las CyPGs sobre la expresión de CD69 y CD71 en la membrana de células T.** PBLs y linfocitos T (LTs) humanos fueron incubados con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM), PGA<sub>1</sub> (10 y 15 μM), durante 1 hora antes de ser estimulados con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) o anti-CD3 (αCD3, 5 μg/ml) + anti-CD28 (αCD28, 1 μg/ml) durante 18 horas. Los niveles de CD69 (**A**) y CD71 (**B**) en membrana fueron analizados mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran como % de células positivas para CD69 o CD71, siendo la media de 3 réplicas ± SD. Los resultados presentados son representativos de 3 experimentos independientes. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 respecto a células sin estimular incubadas con vehículo. No significativo (ns); \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto a células estimuladas con TPA+Ion o con αCD3+αCD28.

El análisis de las acciones de las CyPGs sobre la proliferación celular se llevó a cabo a través del uso de la sonda fluorescente *Cell Trace Violet* (CTV), que permite determinar mediante citometría de flujo el número de divisiones celulares. La incubación de PBLs con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> de forma previa a la activación con αCD3+αCD28, puso de manifiesto que estas CyPGs inhibían, de forma dependiente de la concentración, la proliferación celular inducida tras la activación. Como se muestra en la figura 2 la señal de fluorescencia,

que disminuye a lo largo de las divisiones celulares inducidas por la activación celular en células que no fueron preincubadas con CyPGs, en presencia de éstas muestra valores más próximos a los obtenidos en células en reposo.



**Figura 2: Efecto de las CyPGs sobre la proliferación de PBLs.** PBLs incubados con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM) o PGA<sub>1</sub> (10 y 15 μM) 1 hora antes de ser estimulados con anti-CD3 (αCD3, 5 μg/ml) + anti-CD28 (αCD28, 1 μg/ml). La proliferación celular se determinó mediante citometría de flujo tras la incubación de las células con la sonda *Cell Trace Violet* (CTV) durante 96 horas. Los histogramas muestran un experimento representativo realizado por triplicado. ###p<0,001 respecto a células control (-). \*p<0,05; \*\*p<0,01 respecto a αCD3+αCD28.

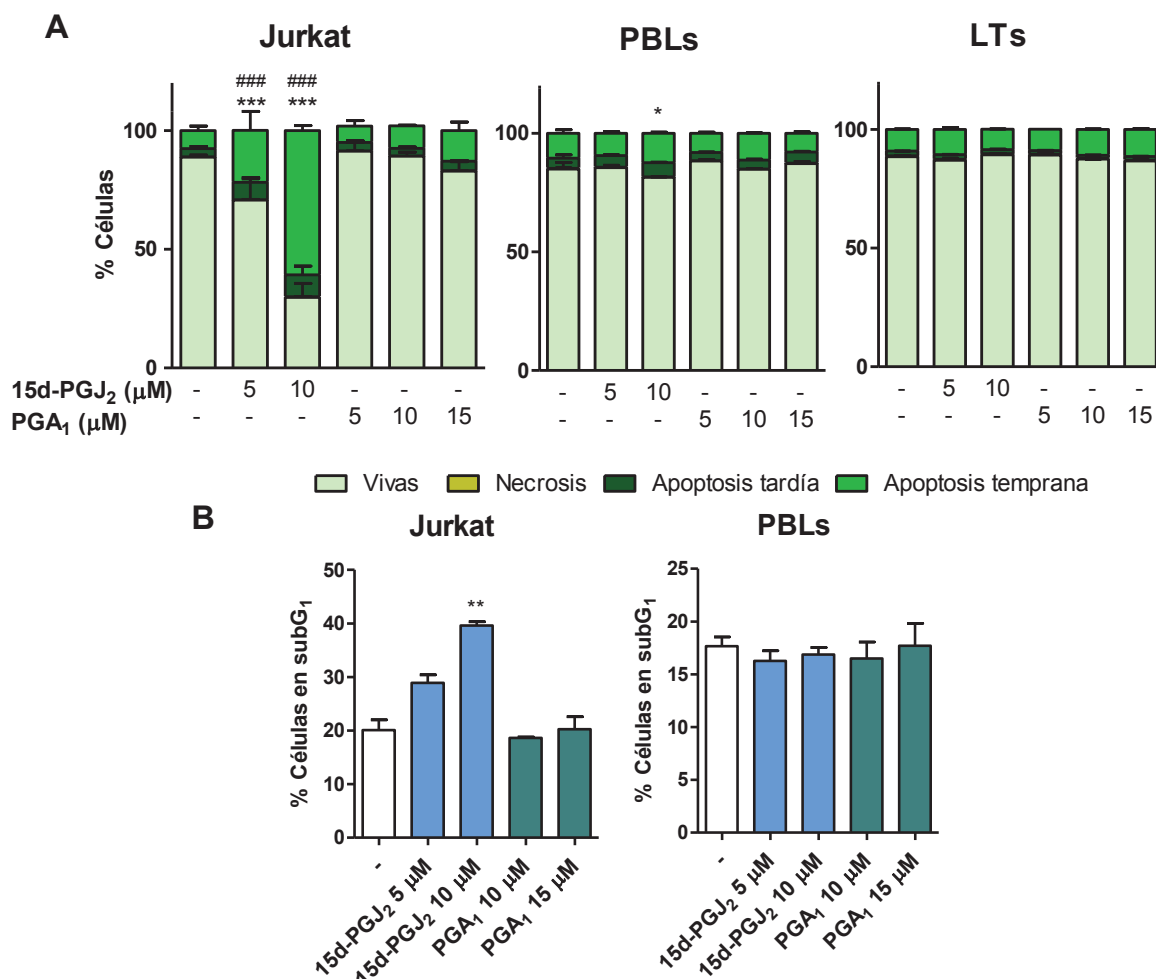
## 1.2. Efecto diferencial de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la inducción de muerte celular

Además de inhibir la proliferación celular, se ha descrito que las CyPGs pueden inducir apoptosis en diferentes tipos celulares tumorales en función de la dosis utilizada y por distintos mecanismos. Así, se ha descrito que las CyPGs promueven la muerte celular induciendo apoptosis, estrés oxidativo o inhibiendo la transcripción de genes implicados en supervivencia celular, entre otros mecanismos (Diez-Dacal y Perez-Sala, 2012; Straus y Glass, 2001).

Por esta razón, analizamos el efecto de diferentes concentraciones de 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM) o PGA<sub>1</sub> (5-15 μM) sobre la viabilidad celular en PBLs, LTs y células Jurkat. Tras 18 horas de incubación con las CyPGs, se determinó en las células, mediante citometría



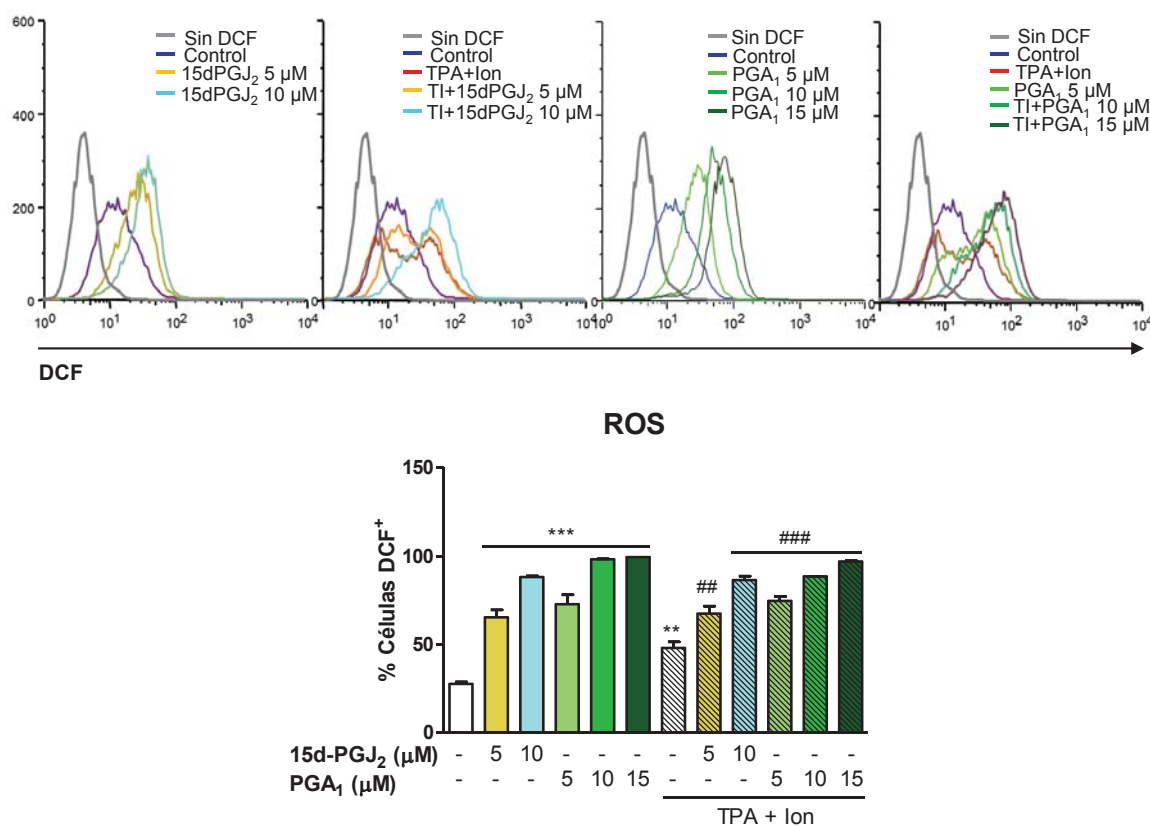
de flujo, la apoptosis temprana (anexina V<sup>+</sup>, 7AAD<sup>-</sup>), apoptosis tardía (anexina V<sup>+</sup>, 7AAD<sup>+</sup>) y necrosis (anexina V<sup>-</sup>, 7AAD<sup>+</sup>) (Figura 3A). Sólo se observó un incremento significativo de la apoptosis en respuesta a dosis crecientes de 15d-PGJ<sub>2</sub>. Este efecto fue mucho mayor en células Jurkat que en PBLs, mientras que no se observaron variaciones significativas en LTs. Por otra parte, no se detectaron variaciones significativas en los niveles de apoptosis tras el tratamiento con PGA<sub>1</sub>, en ninguno de los casos.



**Figura 3: Efecto de las CyPGs sobre la viabilidad de células T. (A)** Células Jurkat, PBLs y linfocitos T (LTs) humanos fueron incubados con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM) o PGA<sub>1</sub> (5, 10 y 15 μM) durante 18 horas. El grado de apoptosis celular se determinó por tinción con Anexina V y 7AAD y fue analizado mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran como la media de 3 réplicas en % de células ± SD. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 células vivas con respecto al control; ###p<0,001 apoptosis temprana con respecto al control. **(B)** Determinación del número de células en la fase subG<sub>1</sub> del ciclo celular de células Jurkat y PBLs. 96 horas después de añadir las CyPGs al medio, las células fueron teñidas con yoduro de propidio y analizadas mediante citometría de flujo. Se muestran los resultados representativos de un experimento realizado en triplicado. \*\*p<0,01 respecto a células control (-).

El marcaje con yoduro de propidio de células incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM) o PGA<sub>1</sub> (10 y 15 μM) (Figura 3B) confirmó, mediante citometría de flujo, que el porcentaje de células con núcleos hipodiploides (subG<sub>1</sub>), característica propia de células en apoptosis/necrosis, es significativamente mayor en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> que en células Jurkat

incubadas con  $\text{PGA}_1$  o sin tratar, no encontrándose diferencias significativas con respecto a las células control, en el caso de los PBLs.



**Figura 4: Efecto de las CyPGs sobre la producción de ROS en células T.** Células Jurkat fueron incubadas con la sonda fluorescente H2DCFDA indicadora de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a continuación tratadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM) o PGA<sub>1</sub> (5, 10 y 15 μM) una hora antes de ser estimuladas con TPA (15 ng/ml) + Ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) (TI) durante 3 horas, o en ausencia de dicha estimulación y analizadas mediante citometría de flujo. Los resultados se representan como número de células frente a intensidad de fluorescencia de DCF. La cuantificación muestra la media de 3 réplicas ± SD, en % de células DCF<sup>+</sup> con los diferentes tratamientos. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto a células sin estimular (-) y ##p<0,01; ###p<0,001 respecto a células activadas con TPA+Ion.

Uno de los mecanismos por el que las CyPGs pueden inducir muerte celular tiene que ver con su capacidad para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Koyani et al., 2014; Wang y Mak, 2011). Por tanto, analizamos la producción de ROS en células Jurkat incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub>, con el fin de determinar si las diferencias observadas entre ambas CyPGs se estarían produciendo a este nivel. Para ello incubamos células Jurkat con la sonda fluorescente H2DCFDA, indicadora de la producción de ROS y tratamos las células con distintas concentraciones de CyPGs en presencia o ausencia de activación celular con TPA+Ion. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, tanto la 15d-PGJ<sub>2</sub> como la PGA<sub>1</sub>, incrementan la producción de ROS respecto a las células sin tratar (Control) o a las células activadas (TPA+Ion) de forma dependiente de la concentración (Figura 4). El hecho de que la producción de ROS no sea mayor en células incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> que en aquellas a las que se añadió PGA<sub>1</sub> indicaría que, diferencias en cuanto a

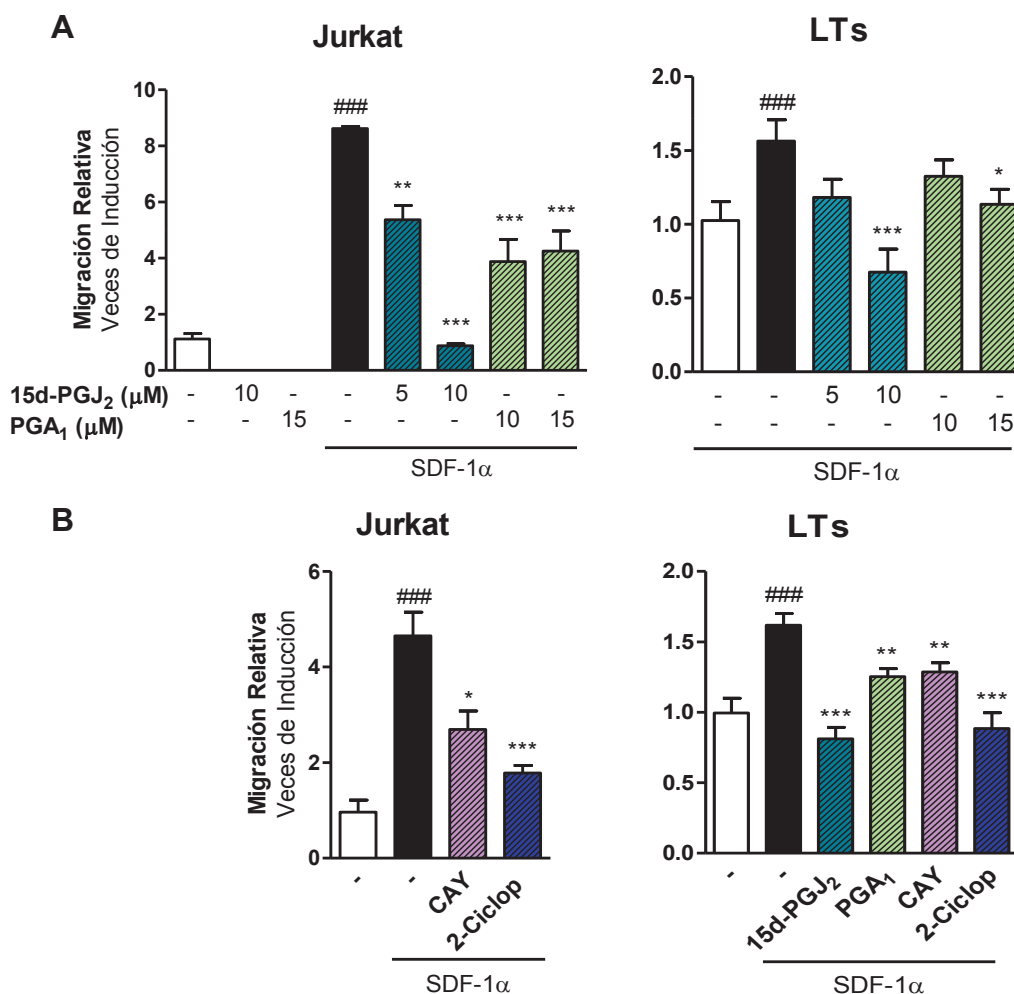
la producción de ROS, no serían la causa de la mayor inducción de muerte celular mediada por la 15d-PGJ<sub>2</sub> en células Jurkat.

### 1.3. Las CyPGs reducen la migración de linfocitos T

Para llevar a cabo sus funciones y mediar en procesos inflamatorios, las células T tienen que migrar al foco inflamatorio. Las células T efectoras expresan moléculas responsables del reconocimiento de distintos ligandos entre los que se encuentran los receptores para quimioquinas, secretadas por macrófagos y células endoteliales en el lugar donde se está produciendo la respuesta inmune. SDF-1 $\alpha$  o CXCL12, es una quimioquina que regula el crecimiento, la supervivencia, la adherencia y la migración de distintos tipos celulares a través de la unión a su receptor, CXCR4, que se expresa en la mayoría de poblaciones de linfocitos T (Baaten et al., 2013; Doring et al., 2014; Fu et al., 2013). La unión de SDF-1 $\alpha$  a CXCR4 activa distintas vías de señalización, tales como la activación de ERK y PI3K, el incremento de los niveles de calcio intracelular, y la internalización y posterior degradación del receptor para finalizar su señalización (Doring et al., 2014).

En primer lugar analizamos si la migración de células T inducida por SDF-1 $\alpha$  se veía afectada por las CyPGs, para lo cual incubamos células Jurkat o LTs (Figura 5A) con las concentraciones señaladas de 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> durante 60 minutos antes de añadir las células a los pocillos *transwell*, donde se cultivaron durante 4 horas para estimar la migración hacia los pocillos inferiores que contenían medio de cultivo sin o con quimioquina SDF-1 $\alpha$  (50 ng/ml). El recuento celular puso de manifiesto que esta quimioquina fue capaz de inducir la migración tanto de células Jurkat como de LTs, y que en ambos casos, la migración celular se vio inhibida en presencia de dosis crecientes de 15d-PGJ<sub>2</sub>. La migración de estas células también se inhibió de forma significativa en presencia de PGA<sub>1</sub>, si bien esta inhibición fue menor que la mediada por la 15d-PGJ<sub>2</sub>.

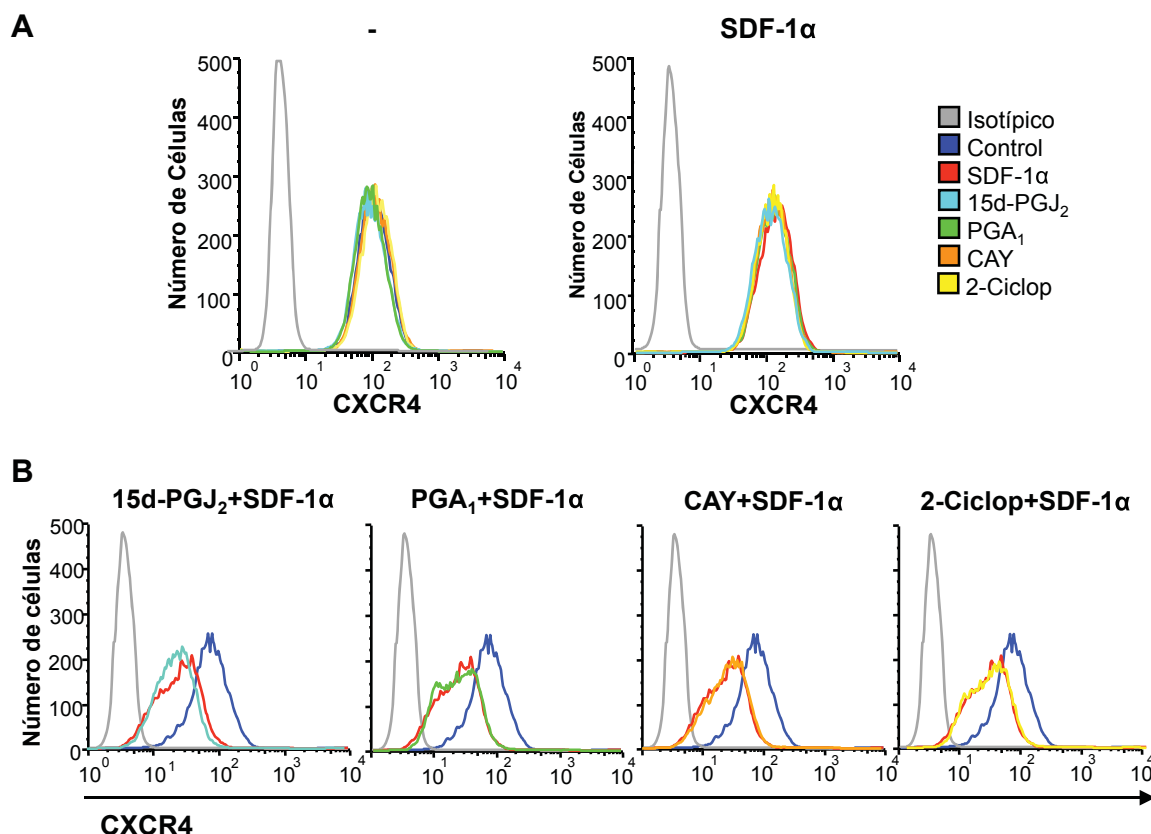
A continuación, para determinar si la inhibición de la migración observada en presencia de las CyPGs es un efecto mediado a través de su unión al receptor PPAR $\gamma$ , analizamos si la migración hacia SDF-1 $\alpha$  se veía inhibida en presencia de otros compuestos relacionados estructural y funcionalmente con la 15d-PGJ<sub>2</sub>, tales como el CAY10410 (9,10-dihidro-15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>), un análogo estructural de la 15d-PGJ<sub>2</sub> con capacidad para unirse a PPAR $\gamma$  pero carente del carbonilo electrofílico del anillo ciclopentenona, y la 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop) que presenta el anillo ciclopentenona sin la cadena lateral de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y que no se une a PPAR $\gamma$  (Figura S1). Los resultados obtenidos (Figura 5B) muestran que la inducción de la migración mediada por SDF-1 $\alpha$  se vio inhibida de forma significativa en presencia de 2-Ciclopenten-1-ona tanto en células Jurkat como en LTs y en menor medida por el ligando de PPAR $\gamma$ , CAY10410. Estos resultados indicarían que en el efecto inhibitor sobre la migración participarían mecanismos dependientes e independientes de PPAR $\gamma$ .



**Figura 5: Efecto de las CyPGs sobre la migración inducida por SDF-1α en células T.** Células Jurkat o linfocitos T humanos se incubaron con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM) o PGA<sub>1</sub> (10 y 15 μM) (**A**) o 15d-PGJ<sub>2</sub> (10 μM), PGA<sub>1</sub> (15 μM), CAY10410 (CAY, 10 μM) o 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop, 250 μM) (**B**), 1 hora antes de someterse a migración frente a SDF-1α (50 ng/ml) durante 4 horas en pocillos *transwell*. Los datos se representan como la media de 3 réplicas ± SD, en veces de inducción respecto al número de células migradas en ausencia de quimioquina. ###p<0,01; ####p<0,001 respecto al control sin quimioquina. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto a SDF-1α en ausencia de los compuestos a ensayar.

La señalización a través del receptor CXCR4 conlleva la internalización y posterior degradación del mismo. Por tanto, analizamos si las CyPGs o sus análogos, el CAY10410 y la 2-Ciclopenten-1-ona, producían alguna variación en los niveles de expresión de este receptor. Para ello, se incubaron células Jurkat con estos compuestos a las dosis indicadas, una hora antes de la estimulación celular con SDF-1α durante 60 minutos. Los niveles totales de CXCR4 celular se determinaron en células permeabilizadas (Figura 6A), mientras que la expresión en membrana del receptor se analizó en células intactas (Figura 6B). Los resultados obtenidos indican que ninguno de estos compuestos produjo cambios notables respecto a los niveles totales de CXCR4 detectados en células sin tratar (control) o tras el tratamiento con SDF-1α (Figura 6A). Dado que los compuestos estudiados no afectaban a la expresión del receptor, pasamos a determinar si tenían algún efecto sobre la

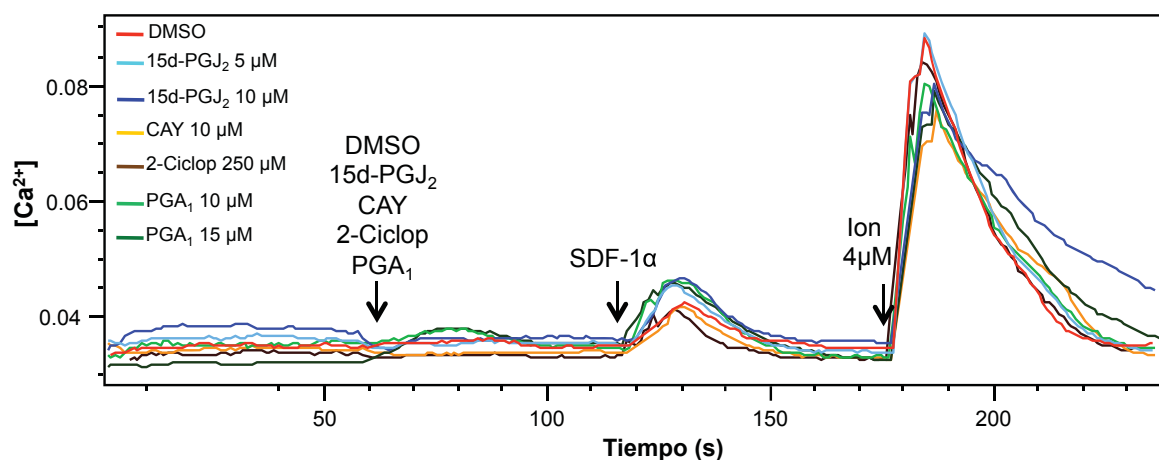
internalización del mismo. Como se muestra en la figura 6B, tras 60 minutos de tratamiento con SDF-1 $\alpha$ , se produce una notable disminución de la expresión en membrana de CXCR4, lo que da cuenta de su internalización. Ninguna de las CyPGs, ni de los análogos estructurales de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, afectó significativamente a la internalización del receptor, de forma que no se detectaron cambios en los perfiles obtenidos por citometría de flujo.



**Figura 6: Efecto de PGA<sub>1</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub> y sus análogos, sobre los niveles de CXCR4.** Se incubaron células Jurkat con 15d-PGJ<sub>2</sub> (10  $\mu$ M), PGA<sub>1</sub> (15  $\mu$ M), CAY10410 (CAY, 10  $\mu$ M) o 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop, 250  $\mu$ M) en ausencia o en presencia de SDF-1 $\alpha$  (50 ng/ml). La expresión de CXCR4 se determinó mediante citometría de flujo. **(A)** Niveles totales de CXCR4 en células permeabilizadas. **(B)** Análisis de la expresión en membrana de CXCR4. Los gráficos muestran perfiles con el número de células respecto a la intensidad media de fluorescencia de CXCR4, de un experimento representativo de tres ensayos independientes.

Tras determinar que las CyPGs no influían sobre los niveles de CXCR4, se analizó el posible efecto de las mismas sobre la señalización mediada por este receptor, con la idea de analizar si ésta se estaba viendo afectada y pudiera explicar la influencia de los compuestos ensayados sobre la migración en respuesta a SDF-1 $\alpha$ . Tras la unión de SDF-1 $\alpha$  a CXCR4 se activa la fosfolipasa C, produciéndose un incremento en los niveles de calcio intracelular. Mediante ensayos de citometría de flujo, se determinaron los niveles de calcio intracelular utilizando las sondas fluorescentes Fluo-3 y Fura Red. Como se muestra en la figura 7, el tratamiento de células Jurkat con SDF-1 $\alpha$  promovió un incremento en la señal de calcio intracelular de forma rápida y transitoria. La incubación de las células con las CyPGs, el CAY10410 o la 2-Ciclopenten-1-ona no tuvo efectos significativos sobre la liberación de

calcio, ya fuera respecto a los niveles en situación control, o sobre la liberación de calcio inducida por la quimioquina. Como control, se usó un ionóforo de calcio (Ion, 4  $\mu$ M) que determinó los niveles máximos de liberación de calcio.

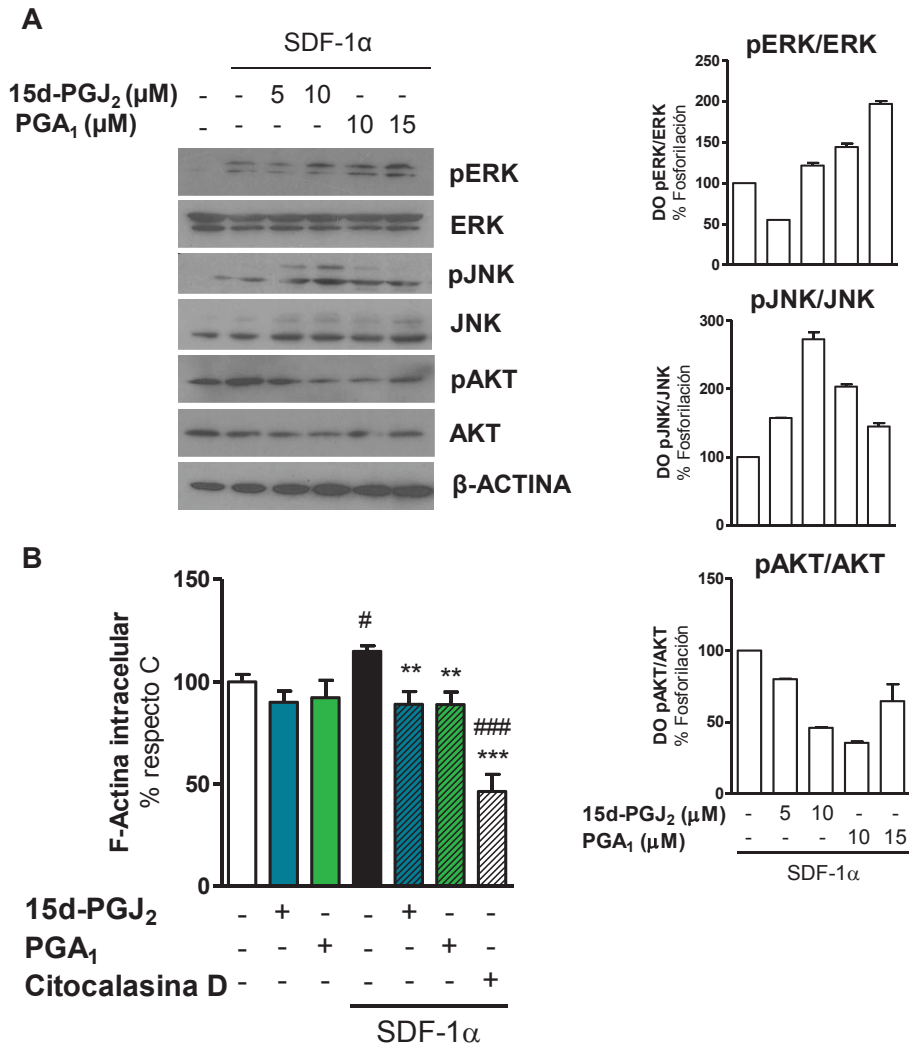


**Figura 7: Efecto de  $\text{PGA}_1$ , 15d-PGJ<sub>2</sub> y sus análogos sobre la movilización de calcio intracelular mediada por SDF-1 $\alpha$ .** Células Jurkat se incubaron con las sondas fluorescentes indicadoras de calcio, Fluo-3 y Fura Red. Mediante citometría de flujo se analizó el incremento de la fluorescencia en respuesta a SDF-1 $\alpha$  (50 ng/ml) y tras el tratamiento con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10  $\mu$ M), CAY10410 (CAY, 10  $\mu$ M), 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop, 250  $\mu$ M) o  $\text{PGA}_1$  (10 y 15  $\mu$ M) a lo largo del tiempo. El ionóforo de calcio (Ion, 4  $\mu$ M) se añadió en último lugar para establecer la máxima cantidad de calcio movilizable. Las flechas indican el momento de adición de los diferentes compuestos. Los cambios en la concentración de calcio se representan como ratio de la intensidad Fluo-3/Fura Red respecto al tiempo (s).

A continuación, analizamos si otras vías de señalización activadas por SDF-1 $\alpha$ , necesarias para la migración de las células T, se estarían viendo afectadas tras el tratamiento con CyPGs. La activación de las MAPKs ERK y JNK, se determinó mediante el análisis de su fosforilación en ensayos de *Western blot* con anticuerpos específicos. Tras determinar el incremento de fosforilación de estas MAPKs en respuesta a SDF-1 $\alpha$  a diferentes tiempos, se estudió el efecto de la incubación con  $\text{PGA}_1$  o 15d-PGJ<sub>2</sub> antes de estimular las células con SDF-1 $\alpha$  durante 5 minutos, tiempo en el cual se produce una inducción apreciable de la fosforilación de ERK y JNK. Como se muestra en la figura 8A, el tratamiento con dosis crecientes de CyPGs no tuvo efectos inhibitorios sobre la fosforilación de estas quinasas.

Además de la activación de MAPKs, tras la unión de SDF-1 $\alpha$  a CXCR4 se incrementa la actividad PI3K con un papel importante para la motilidad celular en respuesta a la quimioquina y responsable de la fosforilación de AKT. Como se muestra en la figura 8A, el tratamiento de células Jurkat con SDF-1 $\alpha$  incrementó los niveles de fosforilación de AKT (pAKT) tras 5 minutos de incubación con la quimioquina. El tratamiento con  $\text{PGA}_1$  o 15d-PGJ<sub>2</sub> disminuyó los niveles de pAKT, sugiriendo que estas CyPGs interfieren con la actividad PI3K inducida por SDF-1 $\alpha$ .





**Figura 8: Acciones de las CyPGs sobre la activación de ERK, JNK, AKT y la polimerización de los filamentos de Actina inducidas por SDF-1 $\alpha$ .** (A) Células Jurkat se incubaron 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10  $\mu$ M) o PGA<sub>1</sub> (10 y 15  $\mu$ M) 1 hora antes de la activación celular con SDF-1 $\alpha$  (50 ng/ml) durante 5 minutos. Los niveles totales de ERK, JNK y AKT-1, así como de sus formas fosforiladas (pERK, pJNK y pAKT-1, respectivamente) fueron analizados mediante *Western blot*. Los niveles de  $\beta$ -Actina se determinaron como control de carga. Las gráficas de la derecha muestran la media de densidad óptica (DO)  $\pm$  SD de las bandas de las formas fosforiladas respecto a las no fosforiladas y los niveles de  $\beta$ -Actina, siendo 100% los niveles medidos tras la incubación con SDF-1 $\alpha$ . (B) Las células Jurkat fueron incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> (10  $\mu$ M), PGA<sub>1</sub> (15  $\mu$ M) o Citocalasina D (1  $\mu$ M), una hora antes de tratar con SDF-1 $\alpha$ . La F-Actina se analizó mediante el marcaje de Faloidina-TRITC en el citómetro de flujo. Los datos mostrados son la suma de 3 experimentos independientes, y se representan como la media  $\pm$  SD del % de F-Actina, siendo 100% los niveles medidos en células sin estimular. # $p$ <0,05; ### $p$ <0,001 respecto a células sin estimular. \*\* $p$ <0,01 respecto a SDF-1 $\alpha$ .

Dado que durante la migración se producen cambios en el citoesqueleto, necesarios para que la célula se desplace al foco inflamatorio, y que se ha descrito en otros tipos celulares que las CyPGs interaccionan con proteínas del citoesqueleto (Aldini et al., 2007; Stamatakis et al., 2006), decidimos analizar si la polimerización de Actina para formar filamentos de F-Actina, se estaría viendo afectada en presencia de las CyPGs. En respuesta a la quimioquina SDF-1 $\alpha$  se produce un incremento significativo de la polimerización de

F-Actina, tal y como se muestra en la figura 8B. La pre-incubación de las células Jurkat con CyPGs antes de la estimulación con SDF-1 $\alpha$  redujo los niveles de F-Actina a niveles similares a los obtenidos en células sin estimular. Estos resultados sugerirían que, al menos parcialmente, las acciones inhibitoras de las CyPGs sobre la migración de células T podrían deberse a la disminución del reordenamiento de los filamentos de Actina en respuesta a SDF-1 $\alpha$ .

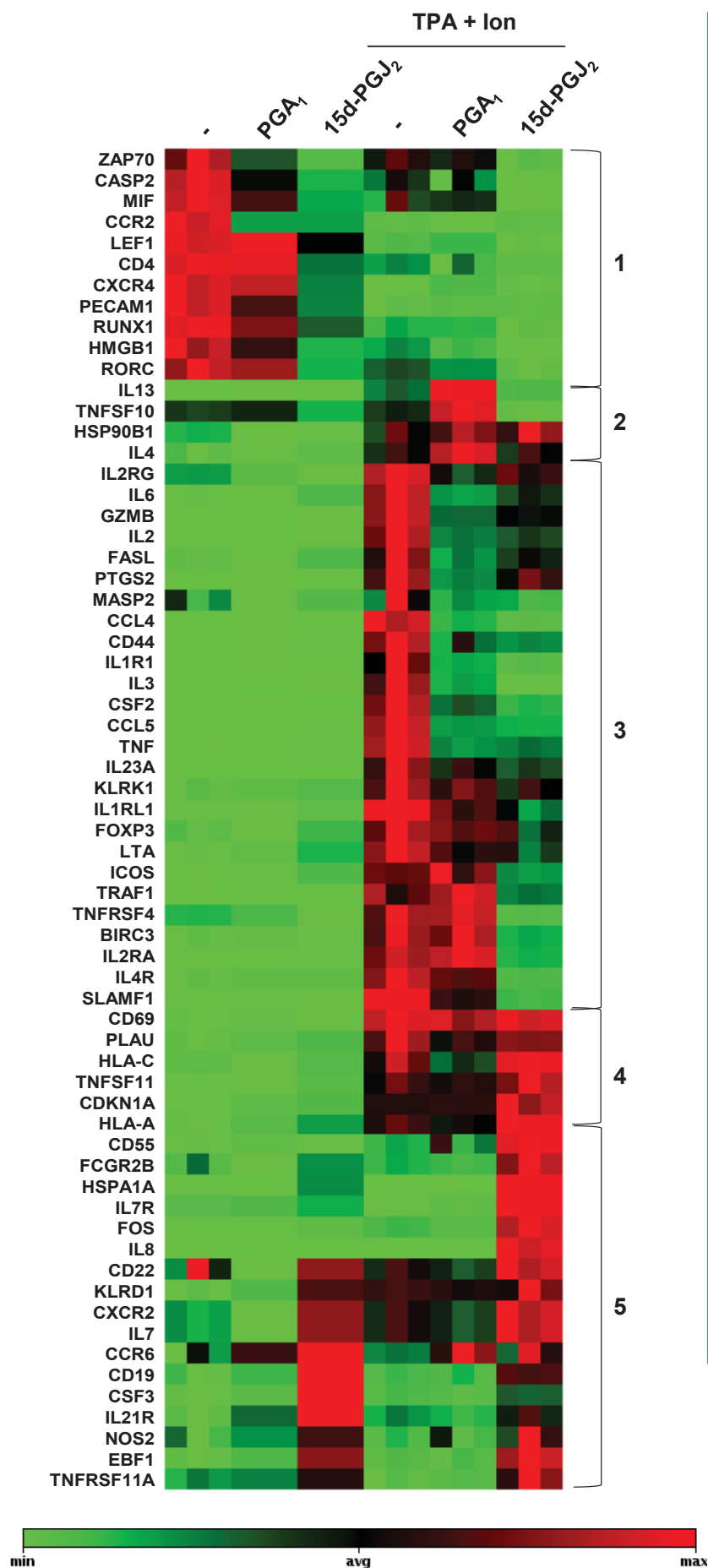
## 2. ACCIONES DE LAS CyPGs SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Tras el reconocimiento por parte del linfocito T del antígeno adecuadamente presentado, se activan una serie de rutas de señalización que culminan con la inducción de la expresión de genes, entre los que se incluyen los que codifican citoquinas, quimioquinas, receptores de membrana para éstas, además de moléculas de adhesión, entre otros.

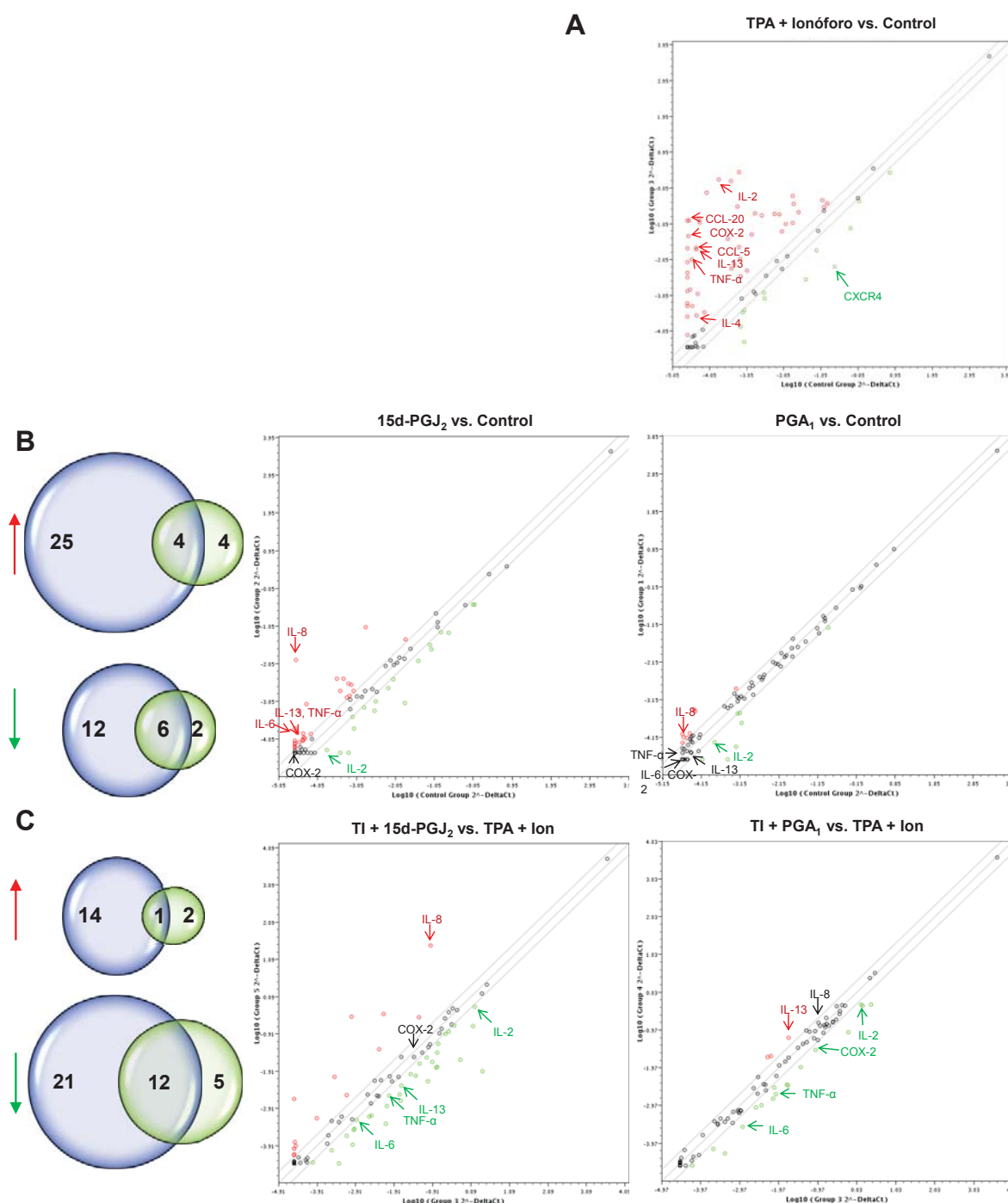
Con el fin de determinar el efecto de las CyPGs sobre la expresión génica en linfocitos T, se analizó la expresión de un grupo de genes seleccionados por su papel en la respuesta inmune, mediante el uso, en primer lugar, de un *array* de qRT-PCR que permitió estudiar 384 genes (*Human Immunology 384 StellarArray*, Lonza), a partir del cual se seleccionaron 96 genes, para su estudio bajo distintas condiciones (*StellarArray* qPCR, Lonza) (Tabla S1). Se partió de ARN aislado de células Jurkat incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> en ausencia de activación celular, o una hora antes de estimular las células con TPA+Ion durante 18 horas. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los obtenidos para genes de referencia como GAPDH,  $\beta$ -Actina y ARNr 18s, cuyos niveles de expresión no se vieron alterados de manera significativa tras los tratamientos efectuados. De los 96 genes analizados, se seleccionaron finalmente los que presentaron valores significativos de expresión, mediante la discriminación por el número de ciclos al que se obtienen unos valores relevantes, de tal forma que se eliminaron aquellos cuyo valor quedaba por encima de 35 ciclos. Los cambios en la expresión se consideraron significativos a partir de un cambio de más de dos veces con respecto al valor del tratamiento de referencia en cada caso (ej: CyPG vs basal, CyPG + TPA+Ion vs TPA+Ion).

Según los cambios observados en los valores de expresión obtenidos tras los diferentes tratamientos entre los genes finalmente seleccionados, se establecieron 5 categorías (Figura 9): Grupo 1, con genes que se expresan en células sin estimular y cuya expresión disminuye tras el tratamiento con TPA+Ion o CyPGs; Grupo 2, con genes cuya expresión se induce con TPA+Ion, y experimentan un incremento adicional en presencia de PGA<sub>1</sub>, pero no con la incubación con 15d-PGJ<sub>2</sub>, la cual incluso disminuyó su expresión con respecto a los niveles obtenidos con TPA+Ion; Grupo 3, de genes cuyos niveles de expresión aumentan tras la activación con TPA+Ion y disminuyen en presencia de ambas CyPGs; Grupo 4, genes que incrementan su expresión tras la activación celular y que se inducen aún más en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub>, pero que no se alteran o disminuyen con PGA<sub>1</sub>; y Grupo 5, de genes que alcanzan su niveles máximos de expresión en presencia 15d-PGJ<sub>2</sub> tanto en situación basal como tras la activación.





**Figura 9: Acciones de las CyPGs sobre la expresión génica en células T.** Células Jurkat fueron incubadas durante 1 hora con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> 10  $\mu$ M, de forma previa a la activación con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1  $\mu$ M) (o en ausencia de activación), durante 18 horas. Se analizó la expresión de 96 genes mediante RT-PCR cuantitativa (*Stell ARray*) por triplicado y los valores de expresión fueron normalizados frente a GAPDH,  $\beta$ -Actina y ARNr 18s. Los datos representados muestran, de forma cualitativa, su grado de expresión respecto a la media de los otros grupos. Los genes seleccionados se agruparon en 5 grupos respecto a la expresión de los mismos en células sin estimular (Control): (1) Genes cuya expresión se ve reducida por todos los tratamientos; (2) Genes cuya expresión se induce tras el tratamiento con TPA+Ion y que se incrementa más en presencia de PGA<sub>1</sub>; (3) Genes cuyos niveles aumentan con TPA+Ion y disminuyen en presencia de ambas CyPGs; (4) Genes que incrementan su expresión tras la activación celular y no disminuyen o se inducen aún más en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> mientras que disminuyen con PGA<sub>1</sub>; (5) Genes que ven incrementada su expresión por la 15d-PGJ<sub>2</sub>.



**Figura 10: Acciones de las CyPGs sobre la expresión génica en células T.** Células Jurkat fueron incubadas durante 1 hora con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> 10  $\mu$ M, antes de la activación celular con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1  $\mu$ M) (o en ausencia de activación), durante 18 horas. Se analizó la expresión de 96 genes mediante RT-PCR cuantitativa (*StellARray*) por triplicado y los valores de expresión fueron normalizados frente a GAPDH,  $\beta$ -Actina y ARNr 18s. Los cambios en la expresión se consideraron significativos a partir de un cambio de más de 2 veces con respecto al valor del tratamiento de referencia en cada caso. Los diagramas de puntos a la derecha muestran genes que incrementan su expresión (rojo), que no ven alterada su expresión (negro) y genes cuya expresión se reduce (verde), respecto al tratamiento de referencia. Los diagramas de Venn representan el número de genes que varían su expresión en las diferentes condiciones. En azul se muestra el número de genes que varía con la 15d-PGJ<sub>2</sub> y en verde los que se alteran con la PGA<sub>1</sub>. **(A)** TPA+Ion vs Control (células sin estimular), **(B)** CyPGs vs Control, y **(C)** CyPGs + TPA+Ion (TI) vs TPA+Ion.

En general, los resultados obtenidos indican que el tratamiento con estas CyPGs es capaz de alterar, de forma selectiva y diferencial, la expresión génica en células Jurkat, tanto en ausencia como en presencia de un estímulo activador como TPA+Ion.

Atendiendo a las variaciones producidas por las CyPGs con respecto a las células control (en ausencia de TPA+Ion), se observó que, de los 96 genes de interés, 55 vieron alterada su expresión de forma significativa tras el tratamiento con una u otra CyPG (Tabla S2). De los genes cuya expresión varió más de 2 veces, se distinguieron varios grupos, según se produjera un incremento o una disminución en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub>. Como se muestra en la figura 10B, 29 genes incrementaron su expresión en respuesta a 15d-PGJ<sub>2</sub> y 8 lo hicieron tras el tratamiento con PGA<sub>1</sub>. De éstos, 4 genes incrementaron su expresión en respuesta a ambas CyPGs, entre los que se encuentra IL-8. Con respecto a aquellos genes cuya expresión disminuyó con respecto al control, 18 lo hicieron en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub>, y 8 con PGA<sub>1</sub>, con 6 de ellos comunes para ambas CyPGs.

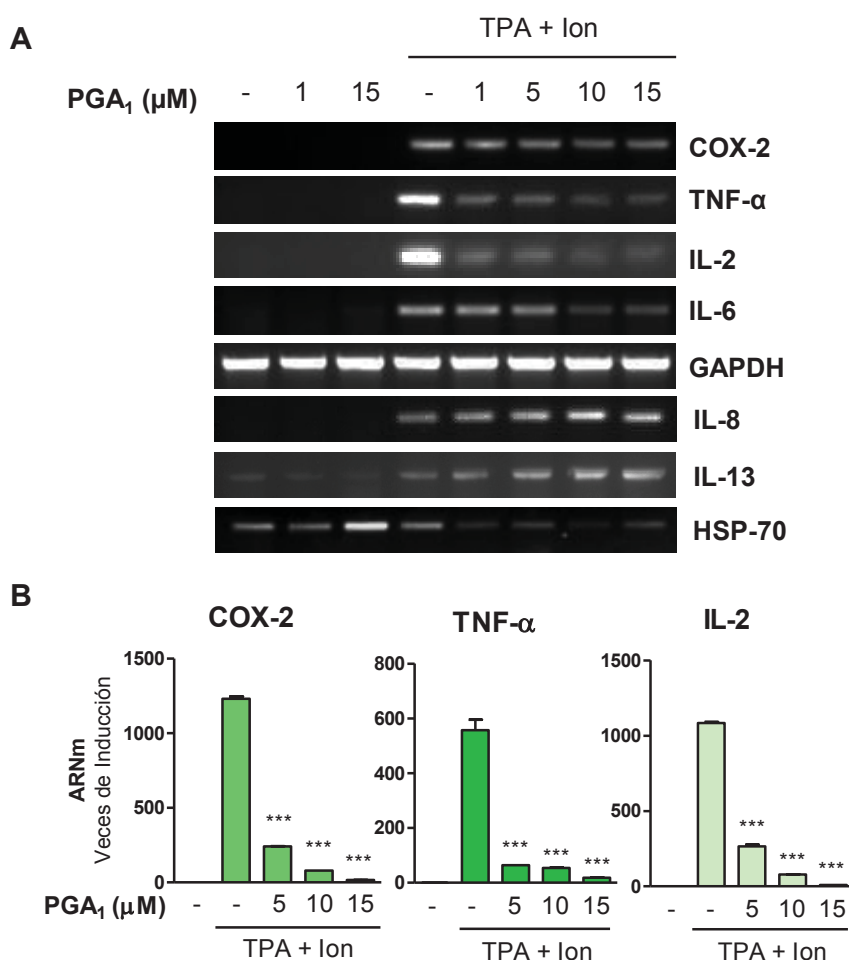
Tras la activación celular se incrementa la expresión de numerosos genes entre los que destacamos los que codifican para distintas citoquinas, tales como IL-2, IL-4, IL-13 y TNF- $\alpha$ , receptores para las mismas, quimioquinas como CCL-5 y CCL-20, u otros como COX-2 necesario para la biosíntesis de prostaglandinas (Figura 10A y Tabla S3). Atendiendo a las variaciones que se producen tras el tratamiento con TPA+Ion en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub>, 41 genes no vieron alterada su expresión de forma significativa (Tabla S4). Entre los que se detectaron diferencias, distinguimos varios grupos según se produjera un incremento o una disminución en presencia de CyPGs con respecto a los niveles obtenidos con TPA+Ion (Figura 10C). Así, 15 genes aumentaron su expresión en el caso de 15d-PGJ<sub>2</sub> y 3 lo hicieron con PGA<sub>1</sub>, la inducción de la expresión de CXCL3 fue común a ambas. Por otro lado, 33 genes disminuyeron su expresión con respecto al tratamiento con TPA+Ion en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> y 17 lo hicieron con PGA<sub>1</sub>, 12 de los cuales fueron comunes a ambas CyPGs, de los que destacamos IL-2, IL-6 y TNF- $\alpha$ .

### 2.1. Acciones de la PGA<sub>1</sub> sobre la expresión génica en células Jurkat

A continuación profundizamos en el estudio de los efectos de las CyPGs sobre algunos de los genes cuya expresión se vio alterada. Con el fin de analizar las acciones de la PGA<sub>1</sub>, se incubaron células Jurkat con distintas concentraciones de esta CyPG (1 a 15  $\mu$ M), tanto en situación basal, como una hora antes de la activación durante 18 horas con TPA+Ion, y analizamos las variaciones en la expresión de genes seleccionados, tanto a nivel de ARNm como de proteína.

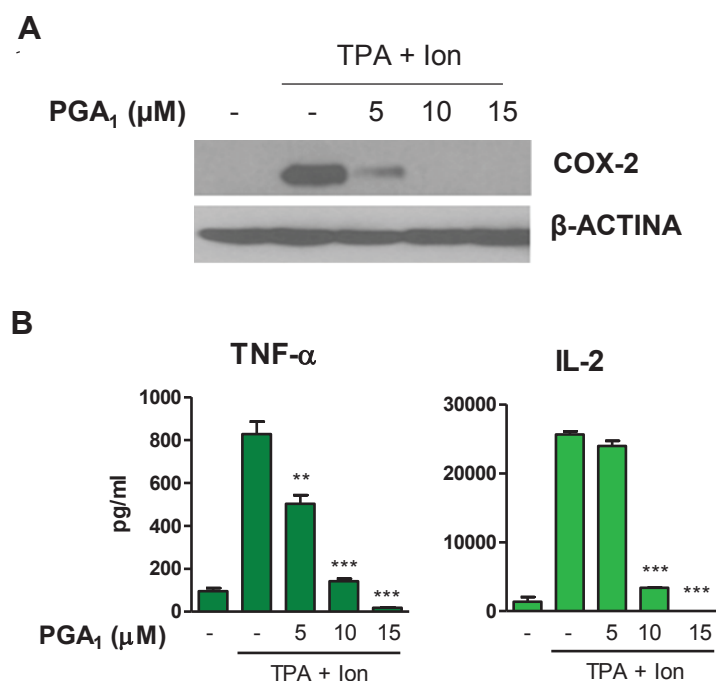
Tras la activación de las células Jurkat con TPA+Ion, se produjo un incremento en los niveles de ARNm de COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-13 (Figura 11A). Dosis crecientes de PGA<sub>1</sub> inhibieron la inducción de la expresión de COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-6. Los datos de RT-PCR convencional sobre la inhibición mediada por la PGA<sub>1</sub> de la expresión de COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-2 fueron confirmados mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 11B). Así mismo, estos estudios confirmaron los resultados obtenidos en el *array*, para genes como IL-8 e

IL-13, los cuales vieron incrementados sus niveles de ARNm con respecto al valor obtenido tras la activación celular, en presencia de dosis crecientes de  $\text{PGA}_1$ . Los niveles de ARNm de la proteína de choque térmico HSP-70, se incrementaron de forma notable en respuesta al tratamiento con esta CyPG con respecto a sus niveles en células no activadas. El análisis de la expresión de GAPDH se utilizó como control.



**Figura 11: Efecto de la  $\text{PGA}_1$  sobre la expresión génica en células Jurkat.** Las células fueron incubadas con  $\text{PGA}_1$  (5, 10 y 15 μM) 1 hora antes de la activación con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) durante 18 horas. **(A)** Análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm de COX-2, TNF-α, IL-2, IL-6, IL-8, IL-13, HSP-70 y GAPDH como control. **(B)** Niveles de expresión de COX-2, TNF-α e IL-2 mediante qRT-PCR. Los datos están representados como la media de veces de inducción respecto al control (células sin estimular) ± SD, y son triplicados normalizados frente a los niveles de ARNm de GAPDH. \*\*\*p<0,001 respecto a TPA+Ion.

Con el fin de determinar si las variaciones en los niveles de ARNm se correspondían con cambios en los niveles de proteína producida, se realizaron ensayos de *Western blot* y de *ELISA*. Como se muestra en la figura 12A, el incremento en los niveles de proteína COX-2 que se produjo tras la activación de células Jurkat con TPA+Ion, se vio reducido de forma sustancial en presencia de dosis crecientes de  $\text{PGA}_1$ . Resultados similares se obtuvieron en el caso de las proteínas IL-2 y TNF-α, analizadas en el sobrenadante celular mediante ensayos *ELISA* (Figura 12B).

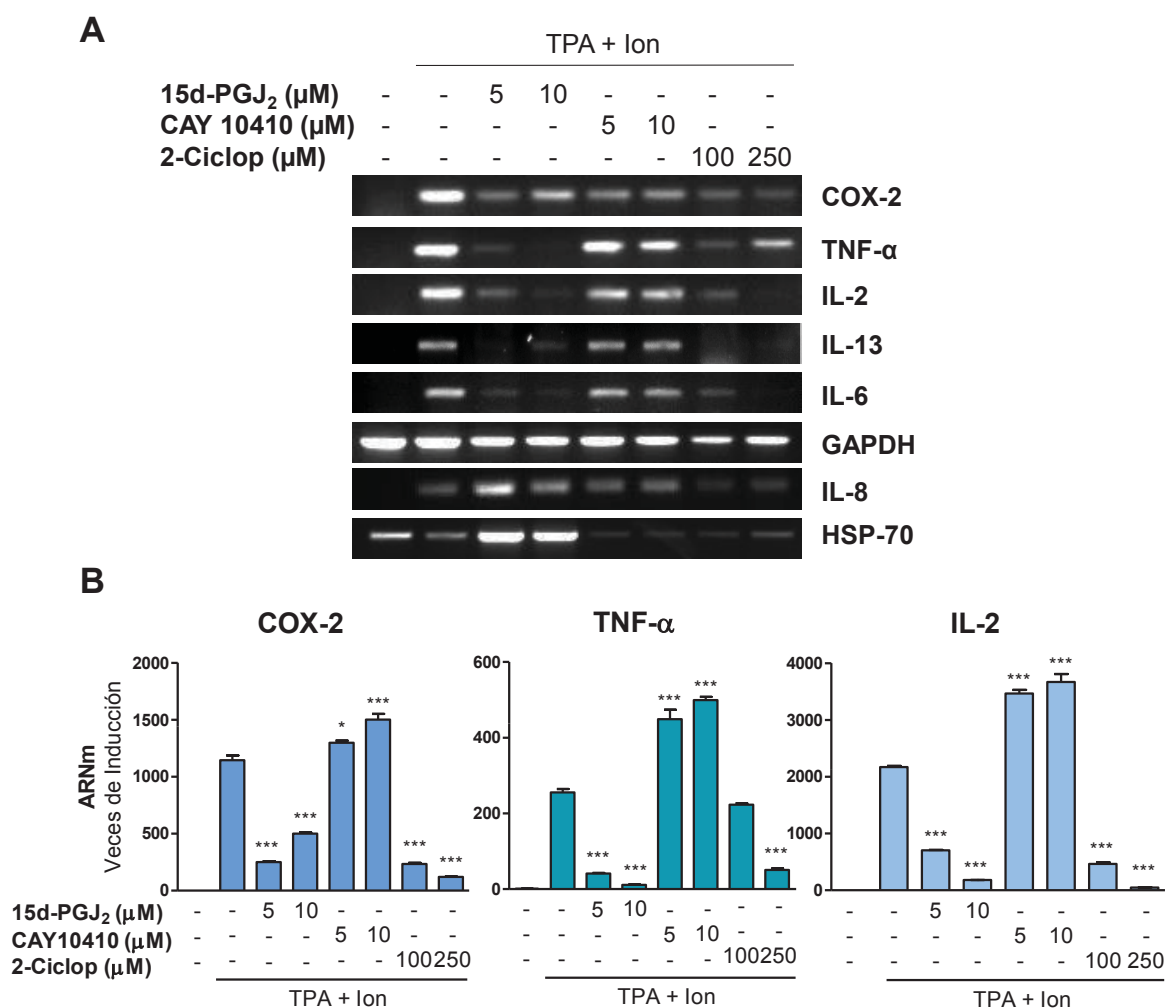


**Figura 12: Análisis de las acciones de la PGA<sub>1</sub> sobre los niveles de proteína COX-2, TNF-α e IL-2 en células T.** Células Jurkat fueron incubadas durante 60 minutos con PGA<sub>1</sub> (5, 10 y 15 μM) antes de la activación celular con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) durante 18 horas. **(A)** Análisis mediante *Western blot* de los niveles de COX-2 y los de β-Actina como control. **(B)** Niveles de TNF-α e IL-2 en el medio celular determinados mediante *ELISA*. Los datos están representados como la media de la concentración en pg/ml ± SD. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto a TPA+Ion.

## 2.2. Acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la expresión génica en células Jurkat

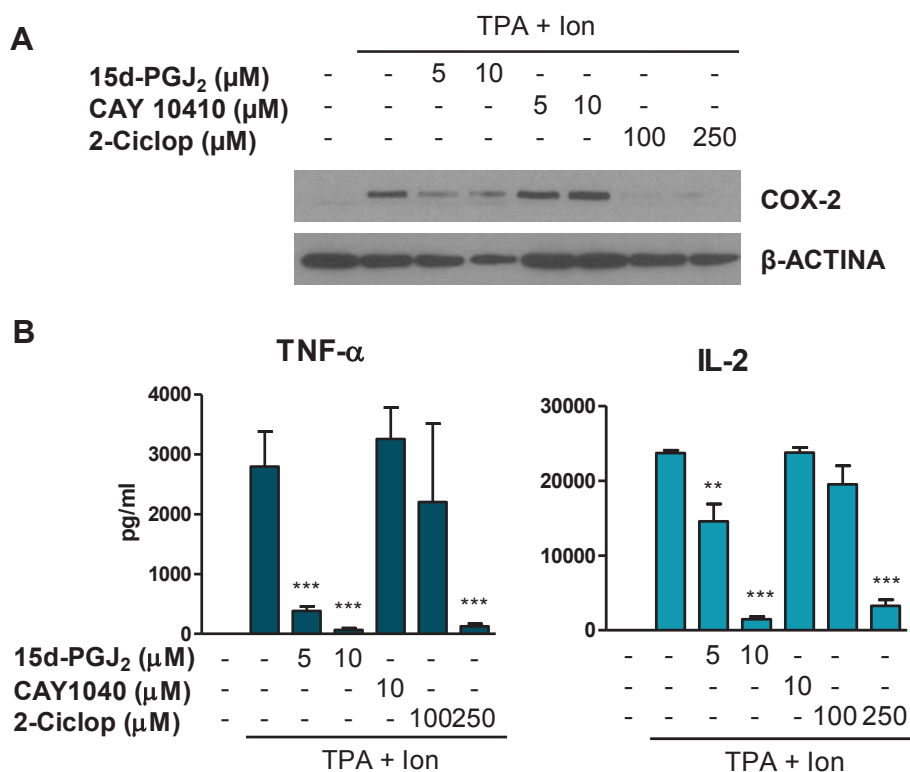
De forma análoga a lo descrito para la PGA<sub>1</sub>, se procedió al estudio en detalle de las acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la expresión de los genes seleccionados. Junto a esta CyPG, se analizó el efecto del CAY10410 y de la 2-Ciclopenten-1-ona, que como se describió anteriormente, difieren en su reactividad hacia grupos tioles y su capacidad para actuar a través de la unión a PPARγ (Figura S1). Las células Jurkat se trataron con distintas dosis de estos compuestos una hora antes de la activación farmacológica con TPA+Ion durante 18 horas. Como se muestra en la figura 13A, el incremento de los niveles de ARNm de COX-2, TNF-α, IL-2 e IL-13 inducido tras la activación celular, se vio sustancialmente disminuido tanto en presencia de la 15d-PGJ<sub>2</sub> como de 2-Ciclopenten-1-ona, mientras que no se observó un efecto notable cuando las células se incubaron con CAY10410. El efecto inhibitor selectivo mediado por aquellos compuestos que tienen el anillo ciclopentenona, se confirmó mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 13B), observándose que la inducción de la expresión de COX-2, TNF-α e IL-2 mediada por el tratamiento combinado TPA+Ion, se redujo significativamente en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> y 2-Ciclopenten-1-ona y no cuando las células se incubaron con distintas dosis de CAY10410.

Además de efectos inhibidores, y tal y como se observó en los ensayos con los *arrays*, el tratamiento con 15d-PGJ<sub>2</sub> promovió la inducción de ciertos genes como IL-8 y HSP-70 (Figura 13A).



**Figura 13: Efecto de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y sus análogos sobre la expresión génica en células Jurkat.** Las células fueron incubadas con vehículo, 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM), CAY10410 (5 y 10 μM) o 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop, 100 y 250 μM) una hora antes de la activación celular con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) durante 18 horas. **(A)** Análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm de COX-2, TNF-α, IL-2, IL-13, IL-6, IL-8, HSP-70 y GAPDH como control. **(B)** Niveles de ARNm de COX-2, TNF-α e IL-2 mediante qRT-PCR. Los datos están representados como la media de veces de inducción respecto al control (células sin estimular) ±SD y son triplicados normalizados frente a los niveles de ARNm de GAPDH. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 respecto a TPA+Ion.

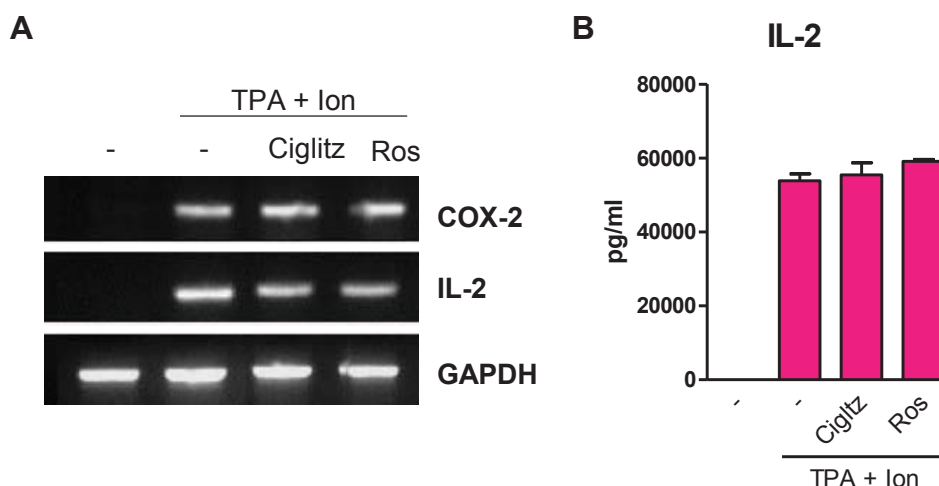
El patrón de expresión observado en cada uno de los tratamientos a nivel de ARNm se confirmó a nivel de proteína, a través del estudio de la expresión de COX-2 mediante *Western blot* (Figura 14A) y de la secreción de IL-2 y TNF-α al medio extracelular mediante ensayos *ELISA* (Figura 14B), obteniéndose resultados comparables a los observados en los ensayos de RT-PCR.



**Figura 14: Análisis de las acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y sus análogos sobre los niveles de proteína COX-2, TNF-α e IL-2 en células Jurkat.** Las células fueron incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM), CAY10410 (5 y 10 μM) o 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop, 100 y 250 μM), una hora antes de la activación celular con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) durante 18 horas. **(A)** Análisis mediante *Western blot* de los niveles de COX-2 y los de β-Actina como control. **(B)** Medida de los niveles de TNF-α e IL-2 en sobrenadantes celulares mediante *ELISA*. Los datos están representados como la media de la concentración en pg/ml ± SD. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto a TPA+Ion.

El hecho de que tanto la 15d-PGJ<sub>2</sub> como la 2-Ciclopenten-1-ona, pero no el CAY10410 mostraran efectos inhibidores sobre la inducción de genes mediada por TPA+Ion, indicaría que estos efectos tendrían lugar de forma independientes de su unión a PPARγ. En este sentido, el análisis de los efectos de ligandos sintéticos de PPARγ como las tiazolidinedionas Ciglitazona (Ciglitaz) y Rosiglitazona (Ros), mostró que ninguno de estos compuestos alteró de forma significativa la inducción de los niveles de ARNm de COX-2 e IL-2 (Figura 15A), así como tampoco se afectó de manera significativa el incremento de la presencia de esta interleuquina en sobrenadantes de células Jurkat estimuladas con TPA+Ion (Figura 15B). La capacidad de estos ligandos de mediar la transcripción dependiente de PPARγ en células Jurkat en situación basal, o tras la sobreexpresión de este receptor, se muestra en la figura S2.





**Figura 15: Análisis de los efectos de las tiazolidinedionas sobre la expresión génica en células Jurkat.** Las células se incubaron durante 1 hora con Ciglitazona (Ciglitaz), Rosiglitazona (Ros), ambas a 10  $\mu$ M y a continuación se estimularon con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1  $\mu$ M) durante 18 horas. **(A)** Se analizaron los niveles de ARNm de COX-2, IL-2 y GAPDH mediante RT-PCR y se resolvieron en geles de agarosa. **(B)** Los niveles de IL-2 se determinaron mediante *ELISA* a partir de los sobrenadantes celulares obtenidos. Los datos están representados como la media de la concentración en pg/ml  $\pm$  SD.

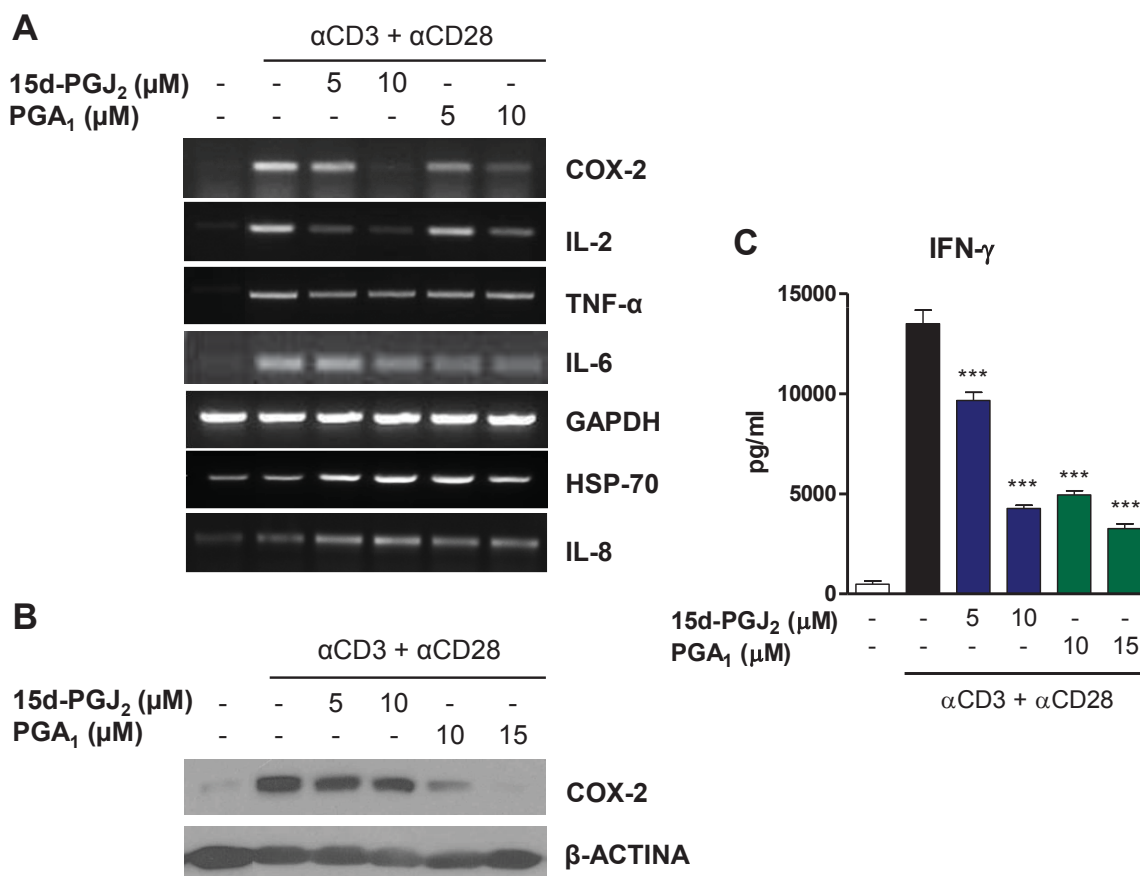
Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los ligandos sintéticos utilizados no tienen el efecto inhibitorio del agonista natural del PPAR $\gamma$  sobre los genes analizados, reafirmando la hipótesis de que el efecto inhibitorio de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la inducción de los genes COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-13 e IL-6 en células Jurkat se debería principalmente a su capacidad para modificar proteínas celulares y no a su actividad a través de este receptor nuclear.

### 2.3. Acciones de las CyPGs sobre la expresión génica en linfocitos T

Con el fin de determinar si los efectos de las CyPGs sobre la expresión génica en células Jurkat ocurrían también en células primarias, se analizaron mediante RT-PCR, los niveles de ARNm de algunos de los genes de interés en PBLs. Estas células se incubaron con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> (5 y 10  $\mu$ M) una hora antes de ser activadas con los anticuerpos agonistas  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28, que promueven la activación de los linfocitos T. Como se muestra en la figura 16A, tanto 15d-PGJ<sub>2</sub> como PGA<sub>1</sub> mostraron efectos inhibitorios dependientes de la concentración, sobre la inducción de la expresión de COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-6 promovida por  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28.

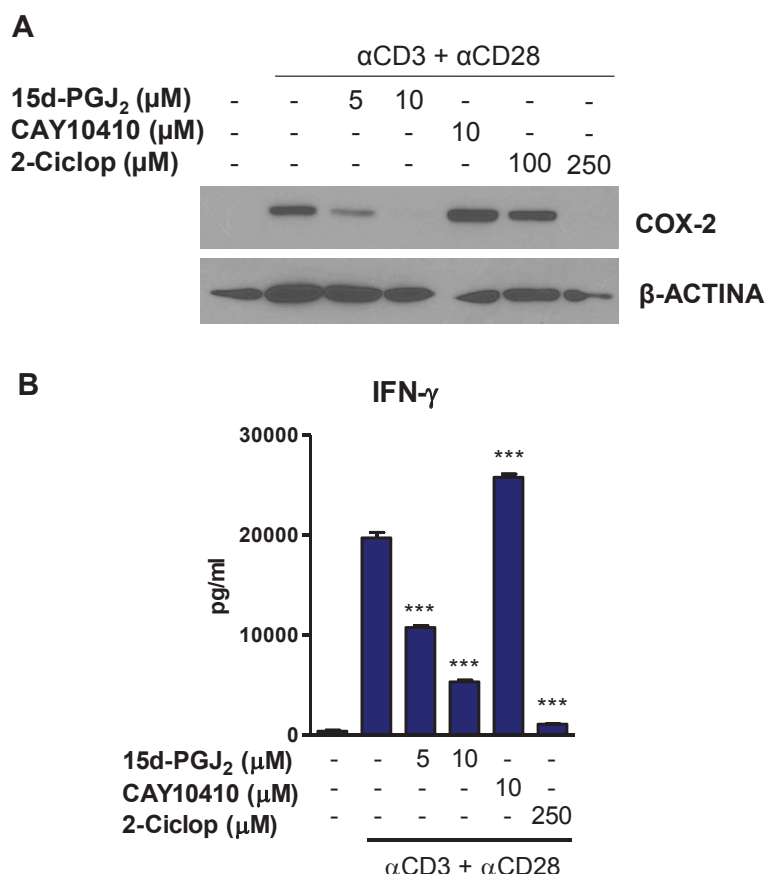
El análisis de los niveles de proteína COX-2, confirmó el perfil de expresión observado a nivel de ARNm (Figura 16B). El estudio de la producción de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes celulares, muestra como el incremento de los niveles de esta citoquina tras la activación celular se vio reducido con dosis crecientes de ambas CyPGs (Figura 16C). Aunque a diferentes niveles, la expresión de IL-8, y HSP-70 se vio incrementada en presencia de las CyPGs respecto a la inducción llevada a cabo por el combinado  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28 (Figura 16A).





**Figura 16: Análisis de las acciones de las CyPGs sobre la expresión génica en PBLs.** PBLs humanos fueron incubados con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10  $\mu$ M), o PGA<sub>1</sub> (10 y 15  $\mu$ M) 1 hora antes de su estimulación con anti-CD3 ( $\alpha$ CD3, 5  $\mu$ g/ml) y anti-CD28 ( $\alpha$ CD28, 1  $\mu$ g/ml) durante 18 horas. **(A)** Los niveles de ARNm de COX-2, IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, HSP-70, IL-8, y GAPDH, como control, se analizaron mediante RT-PCR y se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa. **(B)** Los niveles de COX-2 fueron analizados mediante *Western blot*, usando  $\beta$ -Actina como control. **(C)** Los niveles de IFN- $\gamma$  se determinaron en los sobrenadantes celulares mediante *ELISA*, están representados como la media de la concentración en pg/ml  $\pm$  SD. \*\*\*p<0,001 respecto a  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28. Los resultados mostrados son representativos de 3 donantes independientes.

Comparamos los efectos de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la expresión génica con los producidos por sus análogos estructurales, CAY10410 y 2-Ciclopenten-1-ona en células primarias mediante *Western blot* y ensayos *ELISA*. Como se muestra en la figura 17, los niveles de expresión de genes como COX-2 e IFN- $\gamma$  inducidos por  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28, se redujeron significativamente, de manera dependiente de la dosis, por la incubación con 15d-PGJ<sub>2</sub> y 2-Ciclopenten-1-ona a la mayor dosis ensayada, mientras que el CAY10410, no mostró este efecto inhibitor, tal y como ocurría en células Jurkat.



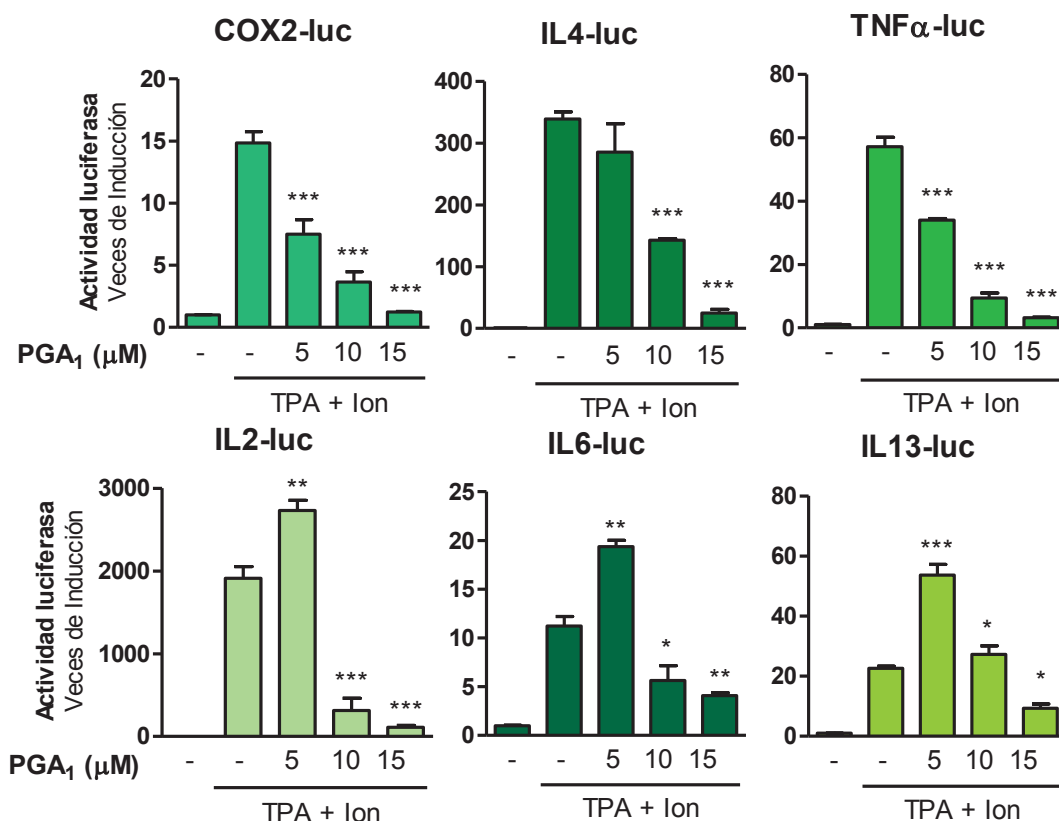
**Figura 17: Análisis de las acciones de 15d-PGJ<sub>2</sub> y sus análogos sobre los niveles de proteína COX-2 e IFN- $\gamma$  en PBLs.** Células obtenidas de donantes sanos fueron incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10  $\mu$ M), CAY10410 (10  $\mu$ M) o 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop, 100 y 250  $\mu$ M), 60 minutos antes de su estimulación con anti-CD3 ( $\alpha$ CD3, 5  $\mu$ g/ml) y anti-CD28 ( $\alpha$ CD28, 1  $\mu$ g/ml) durante 18 horas. **(A)** Los niveles de COX-2 fueron analizados mediante *Western blot*, usando  $\beta$ -Actina como control. **(B)** La expresión de IFN- $\gamma$  se determinó en los sobrenadantes celulares mediante *ELISA*. Los datos están representados como la media de la concentración en pg/ml  $\pm$  SD. \*\*\*p<0,001 respecto a  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28.

## 2.4. Acciones de las CyPGs sobre la regulación de la activación transcripcional

Debido a los efectos inhibidores sobre el incremento en la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio tanto a nivel de proteína como de ARNm, quisimos determinar a qué nivel se estaría produciendo esta inhibición. Para ello estudiamos la actividad transcripcional de algunos de estos genes mediante ensayos luciferasa en células Jurkat transfectadas con plásmidos reporteros en los que la expresión del gen de la luciferasa viene regulada por fragmentos de los promotores de COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-13 e IL-4. Tras la transfección, las células se trataron con concentraciones crecientes de CyPGs, una hora antes de su estimulación con TPA+Ion durante 18 horas.

### 2.4.1. Efectos de la PGA<sub>1</sub> sobre la actividad transcripcional

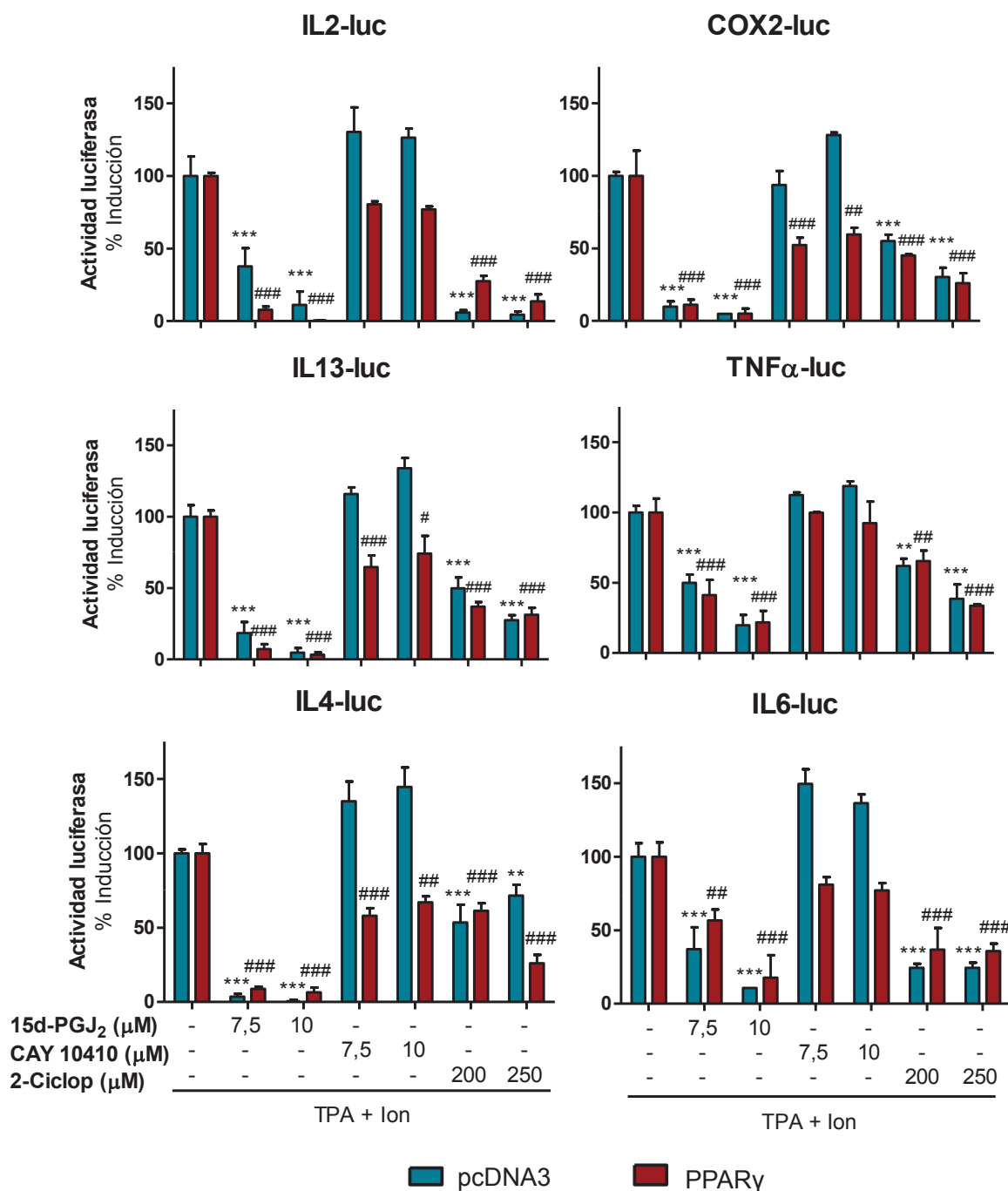
Como se muestra en la figura 18, tras la activación celular se produjo un incremento sustancial de la actividad luciferasa detectada en todos los casos, lo que indica una inducción de la actividad transcripcional de los genes analizados. La PGA<sub>1</sub> inhibió el incremento en la actividad de los promotores de los genes COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-4 de manera dosis-dependiente. En cambio, el efecto inhibitor sobre los promotores de IL-2 e IL-6 sólo se produjo a las concentraciones (10 y 15  $\mu$ M), con un efecto cooperativo en la inducción de estos promotores por TPA+Ion a dosis bajas (5  $\mu$ M). En el caso de IL-13, sólo se observó un efecto inhibitor significativo a la concentración más alta de PGA<sub>1</sub>; produciéndose, a 5  $\mu$ M, un incremento adicional sobre la inducción transcripcional producida por TPA+Ion.



**Figura 18: Efecto de la PGA<sub>1</sub> sobre la actividad transcripcional en linfocitos T.** Células Jurkat fueron transfectadas con los plásmidos reporteros COX2-luc, IL4-luc, TNFα-luc, IL2-luc, IL6-luc e IL13-luc e incubadas con PGA<sub>1</sub> (5, 10 ó 15 μM) de forma previa a la estimulación con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) durante 18 horas. Los datos están representados como veces de inducción ( $RLU_{\text{muestra}}/RLU_{\text{control}}$ ) ± SD, respecto a células sin tratar. Los resultados corresponden a triplicados, y están normalizados respecto a la concentración de proteína presente en los lisados. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto a TPA+Ion.

#### 2.4.2. Acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la actividad transcripcional

El análisis de los efectos de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la actividad de los promotores de los genes seleccionados se realizó, como en el caso de la PGA<sub>1</sub>, mediante ensayos de transfección en células Jurkat y la medida de la actividad luciferasa. Junto a la CyPG, se usaron de nuevo los compuestos CAY10410 y 2-Ciclopenten-1-ona, con el fin de determinar si las acciones observadas tuvieran lugar mediante un mecanismo dependiente o independiente de su unión al receptor nuclear PPARγ. Además, en este caso, se realizaron co-transfecciones con el vector control pcDNA3 o con un plásmido de expresión de PPARγ, junto con los vectores reporteros ya mencionados anteriormente. El análisis de la actividad luciferasa, muestra que, de forma general, tanto la 15d-PGJ<sub>2</sub> como la 2-Ciclopenten-1-ona, pero no así el CAY10410, disminuyen sustancialmente la inducción de la actividad de los promotores de los genes analizados tras la estimulación con TPA+Ion y en ausencia de la sobreexpresión del receptor PPARγ (Figura 19). El CAY10410 sólo mostró una actividad inhibitoria sobre la inducción transcripcional de la mayoría de los promotores analizados en células co-transfectadas con el vector de expresión de PPARγ.



**Figura 19: Efecto de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la actividad transcripcional en células T.** Células Jurkat fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros IL2-luc, COX2-luc, IL13-luc, TNF $\alpha$ -luc, IL4-luc o IL6-luc junto el vector de expresión PPAR $\gamma$  o el vector vacío pcDNA3. Las células se trataron con 15d-PGJ<sub>2</sub> (7,5 ó 10  $\mu$ M) CAY 10410 (7,5 ó 10  $\mu$ M) o 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop, 200 ó 250  $\mu$ M), de forma previa a la estimulación con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1  $\mu$ M) durante 6 horas. Los datos están representados como % de Inducción ( $RLU_{\text{muestra}}/RLU_{\text{control}} \times 100$ )  $\pm$  SD, siendo 100% la actividad luciferasa medida en células estimuladas con TPA+Ion. Los resultados están normalizados respecto a la concentración de proteína presente en los lisados. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a TPA+Ion en co-transfecciones con pcDNA3. # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  respecto a TPA+Ion en co-transfecciones con PPAR $\gamma$ .

## 2.5. Acciones de las CyPGs sobre la activación de factores de transcripción

Una vez definido que las acciones estudiadas de las CyPGs sobre la expresión génica tienen lugar esencialmente a nivel transcripcional, el siguiente paso fue determinar si dicho efecto se debía a la interferencia con la actividad de factores de transcripción como AP-1, NF- $\kappa$ B y NFAT, esenciales en la fisiología del linfocito T y que participan en la regulación de la expresión de los genes ensayados. Para ello, se realizaron ensayos de transfección en células Jurkat, utilizando plásmidos reporteros en los que la expresión del gen indicador luciferasa depende de secuencias de unión para estos factores de transcripción.

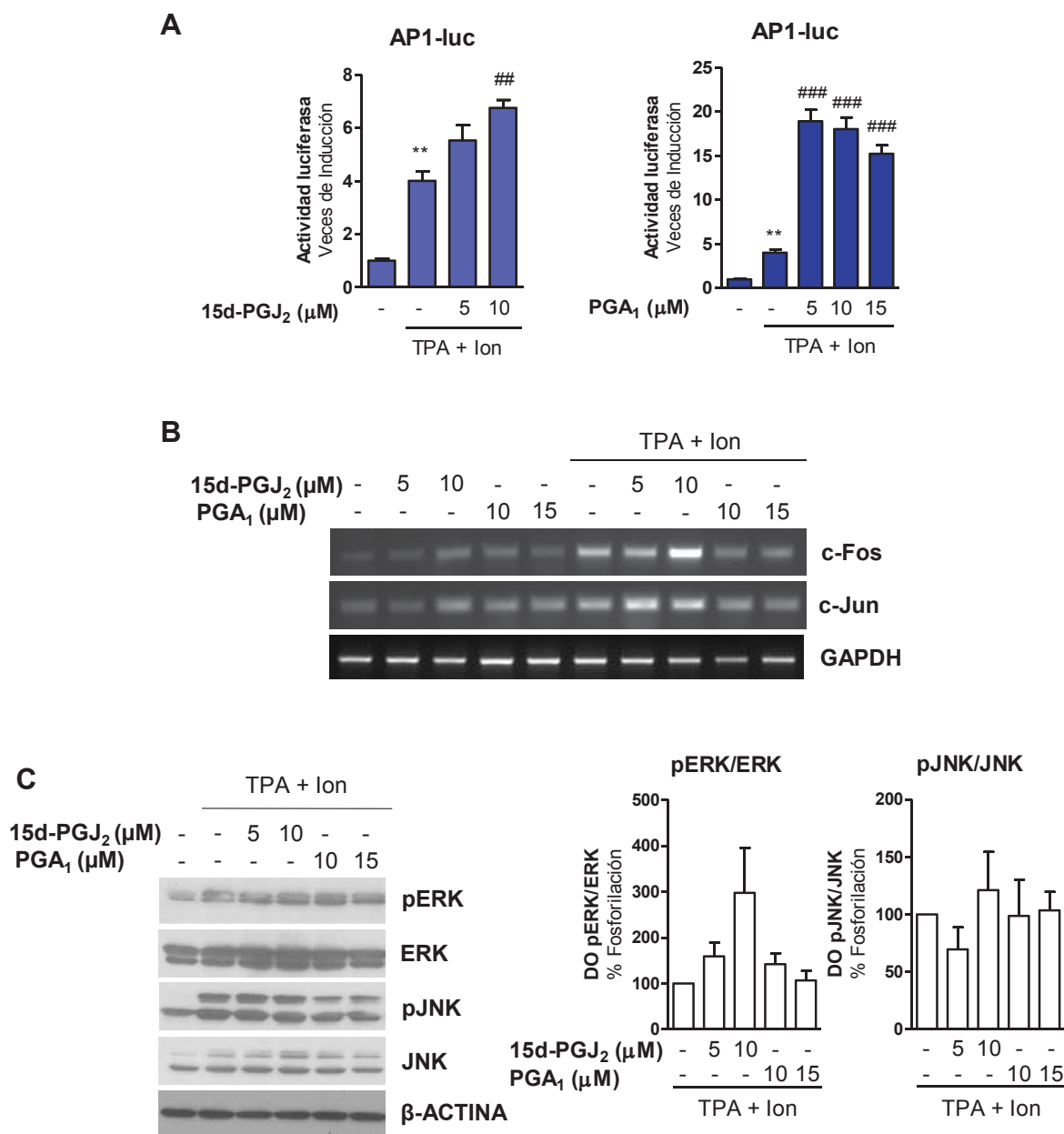
### 2.5.1. Acciones de las CyPGs sobre la activación de AP-1

AP-1 es un factor de transcripción formado por homó u heterodímeros de miembros de las familias c-Fos y c-Jun. Su actividad se induce por distintos estímulos externos, tales como ésteres de forbol (TPA), factores de crecimiento, citoquinas, activadores de células T, neurotransmisores o radiación ultravioleta, mediante la activación de MAPKs de las familias de ERK, JNK y p38. AP-1 participa en la regulación de la expresión de diversos genes en tándem junto al factor nuclear NFAT (Macian 2001).

Diferentes trabajos en otros tipos celulares han puesto de manifiesto que las CyPGs pueden activar la expresión de miembros de la familia AP-1, inducir su activación o por el contrario inhibir ésta, o la unión de este factor de transcripción al ADN (Grau et al., 2004; Ishikawa et al., 2000; Pérez-Sala et al., 2003).

El análisis de la actividad luciferasa de células Jurkat transfectadas con el plásmido reportero AP1-luc (Figura 20A), puso de manifiesto que, tras la estimulación con TPA+Ion, se incrementa la actividad transcripcional dependiente de AP-1. En presencia de dosis crecientes de  $\text{PGA}_1$  o de  $15\text{d-PGJ}_2$  se produce una inducción adicional, más notable en el caso de  $\text{PGA}_1$ . Con el fin de estudiar si el incremento de la actividad transcripcional mediada por AP-1 tras la incubación con las CyPGs, se debía a acciones sobre la expresión de los miembros que forman el factor de transcripción, c-Fos y c-Jun, analizamos mediante RT-PCR los niveles de ARNm de éstos, tras los diferentes tratamientos (Figura 20B). Ambas CyPGs produjeron un incremento en los niveles de ARNm de c-Fos y c-Jun respecto a las células en estado basal. Tras la activación celular con TPA+Ion la expresión de estos genes aumentó, sufriendo un incremento adicional en presencia de la  $15\text{d-PGJ}_2$ .

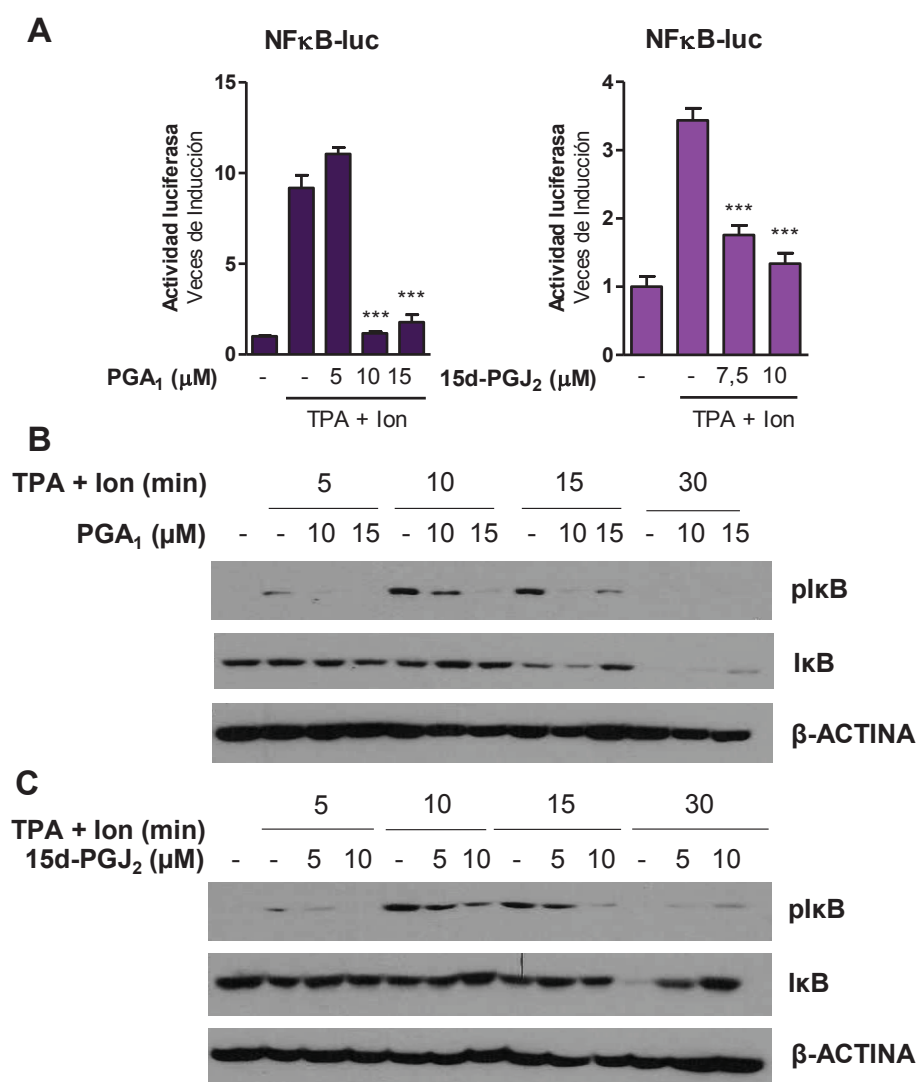
Debido a que la activación de AP-1 se regula por la acción de MAPKs como ERK y JNK, analizamos si las CyPGs tenían algún efecto sobre dicha activación mediante el estudio de la fosforilación de dichas quinasas (Figura 20C). Tras la activación de las células Jurkat con TPA+Ion se produjo un incremento de la fosforilación de ERK y JNK a los 30 minutos. En presencia de  $15\text{d-PGJ}_2$  o  $\text{PGA}_1$  no se inhibieron los niveles de fosforilación de estas MAPKs.



**Figura 20: Efecto de las CyPGs sobre la actividad transcripcional mediada por AP-1 en linfocitos T.** (A) Las células Jurkat se transfectaron con la construcción AP1-luc y se incubaron con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM) o PGA<sub>1</sub> (5, 10 y 15 μM), una hora antes de ser activadas con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) durante 18 horas. Los resultados se representan como veces de inducción ( $RLU_{\text{muestra}}/RLU_{\text{control}}$ )  $\pm$  SD de un experimento representativo realizado por triplicado. \*\*p<0,01; respecto al control; ##p<0,01; ###p<0,001 respecto a TPA+Ion. (B) Determinación mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de c-Fos, c-Jun y GAPDH, como control, en células Jurkat incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> y estimuladas o no, con TPA+Ion durante 18 horas. (C) Western blot en el que se observan los niveles de ERK y JNK, así como de sus formas fosforiladas (pERK y pJNK) en extractos de células Jurkat tratadas con CyPGs en presencia o ausencia de TPA+Ion durante 30 min. Los niveles de β-Actina se determinaron como control de carga. Las gráficas de la derecha muestran la media de densidad óptica (DO)  $\pm$  SD, de las bandas de las formas fosforiladas respecto a las no fosforiladas y los niveles de β-Actina, siendo 100% los niveles medidos tras la incubación con TPA+Ion.

### 2.5.2. Acciones de las CyPGs sobre la activación de NF- $\kappa$ B

La familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B está formada por miembros de las familias c-Rel, p65, RelB, p50 y p52 que interaccionan formando homo u heterodímeros con distintas funciones reguladoras, entre las que se encuentra la regulación de la expresión génica durante el proceso inflamatorio y la respuesta inmune (Hoesel y Schmid, 2013). A lo largo de los últimos años han sido varios los trabajos que han descrito los efectos inhibidores de las CyPGs sobre la actividad de NF- $\kappa$ B a través de diversos mecanismos (Amici et al., 2004; Straus et al., 2000).

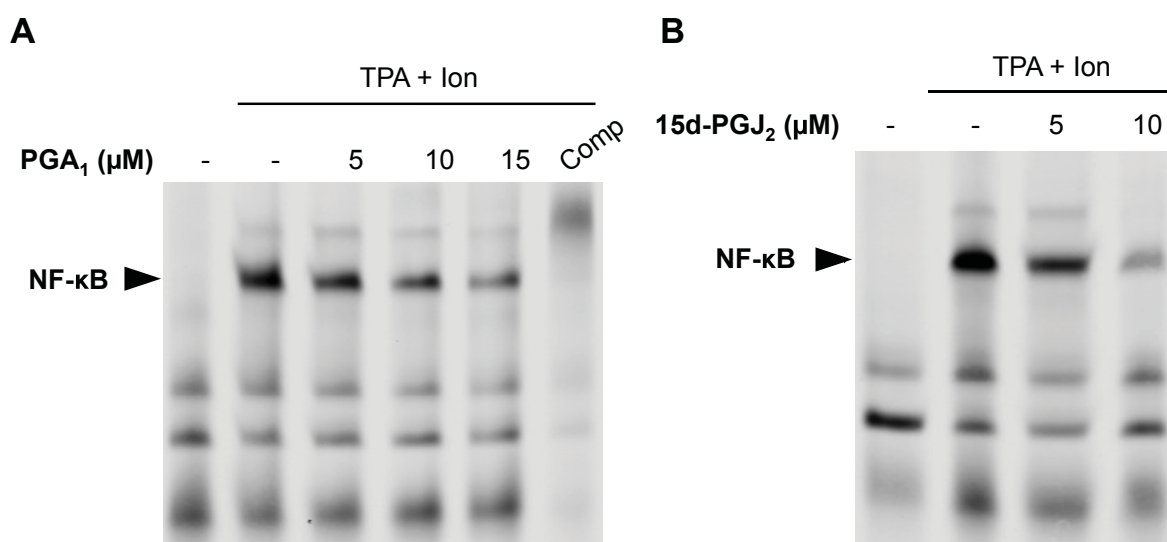


**Figura 21: Efecto de las CyPGs sobre la actividad transcripcional mediada por NF- $\kappa$ B en linfocitos T.** Las células Jurkat se transfectaron con el vector NF $\kappa$ B-luc (**A**) y se incubaron con PGA<sub>1</sub> (5, 10 y 15  $\mu$ M) o 15d-PGJ<sub>2</sub> (7,5 y 10  $\mu$ M) una hora antes de ser activadas con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1  $\mu$ M) durante 18 horas. Los resultados se representan como veces de inducción ( $RLU_{muestra}/RLU_{control}$ )  $\pm$  SD de un experimento representativo realizado por triplicado. \*\*\* $p < 0,001$  respecto a TPA+Ion. Células Jurkat fueron incubadas con PGA<sub>1</sub> (10 y 15  $\mu$ M) (**B**) o 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10  $\mu$ M) (**C**), 60 minutos antes de ser estimuladas con TPA+Ion durante 5, 10, 15 o 30 minutos. Los niveles de I $\kappa$ B total y de su forma fosforilada (pI $\kappa$ B) se determinaron mediante *Western blot*. Los niveles de  $\beta$ -Actina se determinaron como control de carga.



Para confirmar si la inhibición de la actividad transcripcional mediada por NF- $\kappa$ B se veía inhibida en nuestro sistema de estudio, analizamos la actividad transcripcional dependiente de este factor nuclear mediante transfecciones transitorias en las que la expresión del gen de la luciferasa depende de elementos de unión a NF- $\kappa$ B en su región promotora. Como se muestra en la figura 21A, el tratamiento con dosis crecientes de  $\text{PGA}_1$  inhibió el incremento de la actividad de la construcción NF $\kappa$ B-luc mediado por TPA+Ion. El análisis de las acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B, realizado de forma análoga a lo descrito para la  $\text{PGA}_1$ , puso de manifiesto una inhibición de la actividad transcripcional mediada por este factor de transcripción dependiente de la concentración (Figura 21A).

El proceso de activación de NF- $\kappa$ B y su paso al núcleo depende de la fosforilación y consecuente degradación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B (Karin y Ben-Neriah, 2000). Estudios previos han descrito que la  $\text{PGA}_1$  puede interferir con la actividad de NF- $\kappa$ B a través de la interferencia con IKK, y por tanto con la fosforilación y degradación de la proteína I $\kappa$ B (Rossi et al., 2000). Los resultados sobre el efecto de la  $\text{PGA}_1$  en nuestro sistema sobre los niveles de I $\kappa$ B, así como de su forma fosforilada pI $\kappa$ B, a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 30 minutos) tras la estimulación con TPA+Ion se muestran en la figura 21B. Esta CyPG inhibió de manera dependiente de la dosis la inducción de la fosforilación de I $\kappa$ B mediada por TPA+Ion, previniendo la degradación de I $\kappa$ B. Así mismo, al igual que la  $\text{PGA}_1$ , la 15d-PGJ<sub>2</sub> previno la fosforilación de I $\kappa$ B inducida por el combinado TPA+Ion y por tanto su degradación de forma dependiente de la dosis (Figura 21C), lo que resultaría en una disminución del paso al núcleo de NF- $\kappa$ B.



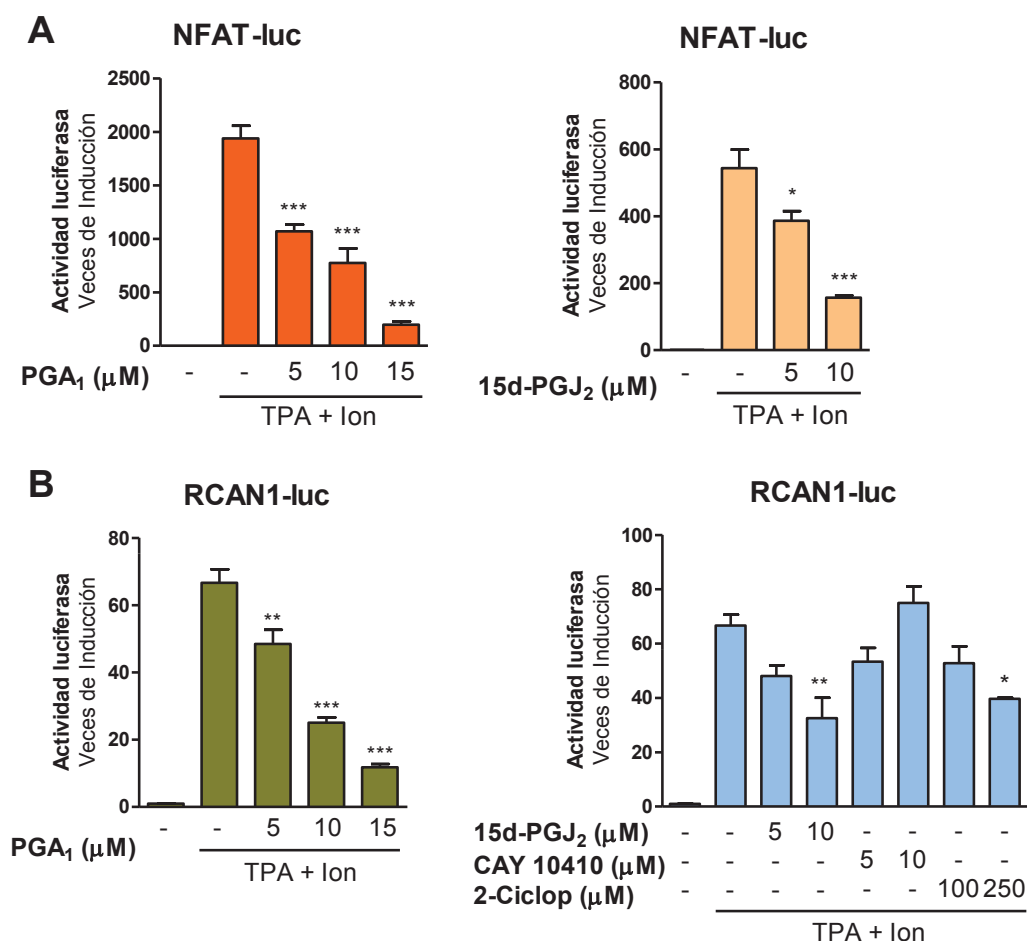
**Figura 22: Efecto de las CyPGs sobre la unión al ADN de NF- $\kappa$ B en células T.** Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) con extractos nucleares de células Jurkat incubados con  $\text{PGA}_1$  (A) o 15d-PGJ<sub>2</sub> (B), una hora antes de ser activadas con TPA+Ion durante 90 minutos. Los extractos se incubaron con una sonda fluorescente de un sitio de unión de NF- $\kappa$ B y los complejos ADN-proteína se resolvieron mediante electroforesis. La especificidad de unión se comprobó añadiendo un exceso del oligonucleótido sin marcar como competidor (Comp). La formación de complejos de retardo se determinó tras la el revelado de los geles de acrilamida.



El efecto de la  $\text{PGA}_1$  sobre la unión al ADN de NF- $\kappa\text{B}$  se determinó mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) (Figura 22A). La estimulación de las células con TPA+Ion incrementó la unión al ADN de este factor de transcripción y dosis crecientes de  $\text{PGA}_1$  redujeron esta unión, que se vio inhibida completamente en presencia de sonda no marcada como competidor específico. Por su parte, al igual que la  $\text{PGA}_1$ , la 15d-PGJ<sub>2</sub> promovió una disminución de la inducción por TPA+Ion de la unión al ADN de NF- $\kappa\text{B}$  a dosis crecientes (Figura 22B).

### 2.5.3. Acciones de las CyPGs sobre la activación de NFAT

El factor de transcripción NFAT es un regulador fundamental de la expresión génica durante la respuesta inmune. Inicialmente descrito en linfocitos T, hoy en día su presencia está ampliamente descrita en distintos tipos celulares, donde una vez en el núcleo regula la expresión génica junto con otros factores de transcripción (Pan et al., 2013).



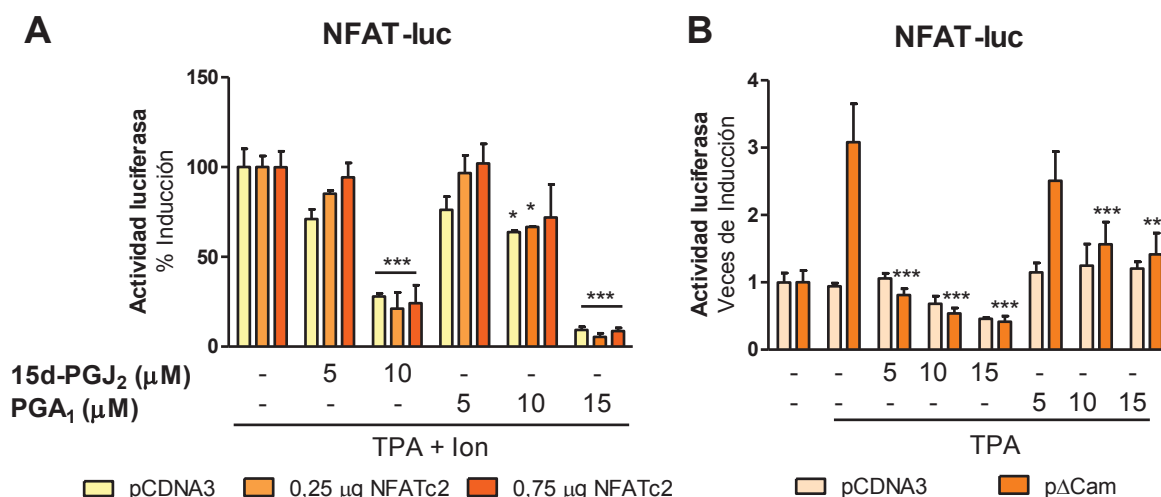
**Figura 23: Efecto de las CyPGs sobre la transcripción mediada por NFAT.** Células Jurkat fueron transfectadas con el vector NFAT-luc (A) o RCAN1-luc (B), e incubadas con  $\text{PGA}_1$  (5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ), 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) o sus análogos CAY10410 (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) o 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop, 100 y 250  $\mu\text{M}$ ), una hora antes de ser estimuladas con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1  $\mu\text{M}$ ) durante 18 horas. Los resultados se representan como veces de inducción ( $\text{RLU}_{\text{muestra}}/\text{RLU}_{\text{control}}$ )  $\pm$  SD. Los resultados representan triplicados de un experimento representativo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto a TPA+Ion.

El análisis de los efectos de las CyPGs sobre la expresión génica mediada por NFAT, se realizó, en primer lugar, llevando a cabo ensayos luciferasa con la construcción NFAT-luc, en la que la expresión del gen reportero de la luciferasa se encuentra regulada por elementos de respuesta a NFAT del promotor de la IL-2 (Rao et al., 1997). Los resultados obtenidos determinaron que la inducción de la transcripción mediada por NFAT en respuesta a TPA+Ion, disminuye de manera dosis-dependiente en presencia de  $\text{PGA}_1$  o de 15d-PGJ<sub>2</sub> (Figura 23A). Dado que la construcción NFAT-luc contiene sitios de respuesta a NFAT que requieren de la unión tanto de NFAT como de AP-1 para ser plenamente funcionales y las CyPGs interfieren con la activación de AP-1, se analizaron los efectos de éstas sobre la actividad transcripcional del promotor de RCAN, que presenta elementos de unión a NFAT en cooperación con otros factores de transcripción como C/EBP $\beta$ , ATF6 y GATA-2/3, con el fin de obtener más evidencias de las acciones de las CyPGs sobre la transcripción dependiente de NFAT. Como se muestra en la figura 23B, tanto la  $\text{PGA}_1$  como la 15d-PGJ<sub>2</sub> disminuyeron la inducción de la transcripción mediada por este promotor de forma significativa. Este efecto inhibitorio se observó también a la mayor dosis ensayada de 2-Ciclopenten-1-ona, mientras que no se apreciaron cambios significativos en presencia del CAY10410 (Figura 23B).

### 3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS CyPGs SOBRE LA ACTIVACIÓN DE NFAT

Los resultados obtenidos mostraban las acciones inhibitorias de las CyPGs sobre la activación transcripcional mediada por NFAT. Con la idea de estudiar en detalle el efecto inhibitorio observado, se realizaron ensayos de co-transfección en células Jurkat con concentraciones crecientes de un vector de expresión de NFATc2 junto con el plásmido reportero NFAT-luc. Como se muestra en la figura 24A, la inhibición de la inducción de la actividad de NFAT-luc llevada a cabo por las CyPGs, a la menor dosis ensayada (5  $\mu\text{M}$ ), fue revertido con el incremento en la cantidad de NFATc2 transfectado. Por su parte, el grado de inhibición que se produce con la mayor dosis ensayada de cualquiera de las CyPGs, no fue revertido en ningún caso con la co-transfección de NFATc2.

La activación de NFAT y su entrada en el núcleo requiere de la desfosforilación de residuos de serina por la acción de la fosfatasa calcineurina (CnA), dependiente de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (Gwack et al., 2007). Esto, junto con la activación de AP-1, supone el estímulo completo para la inducción de genes con elementos de respuesta NFAT/AP-1 como en el caso de la IL-2. De tal manera, la co-transfección con un vector de expresión que codifica una forma constitutivamente activa de la fosfatasa Calcineurina ( $\Delta\text{Cam}$ ) es capaz de cooperar con TPA en la inducción del plásmido reportero NFAT-luc (Figura 24B). Tanto la 15d-PGJ<sub>2</sub> como la  $\text{PGA}_1$  fueron capaces de inhibir la inducción de la activación transcripcional de NFAT-luc promovida por calcineurina, y por tanto dependiente de la activación de NFAT.

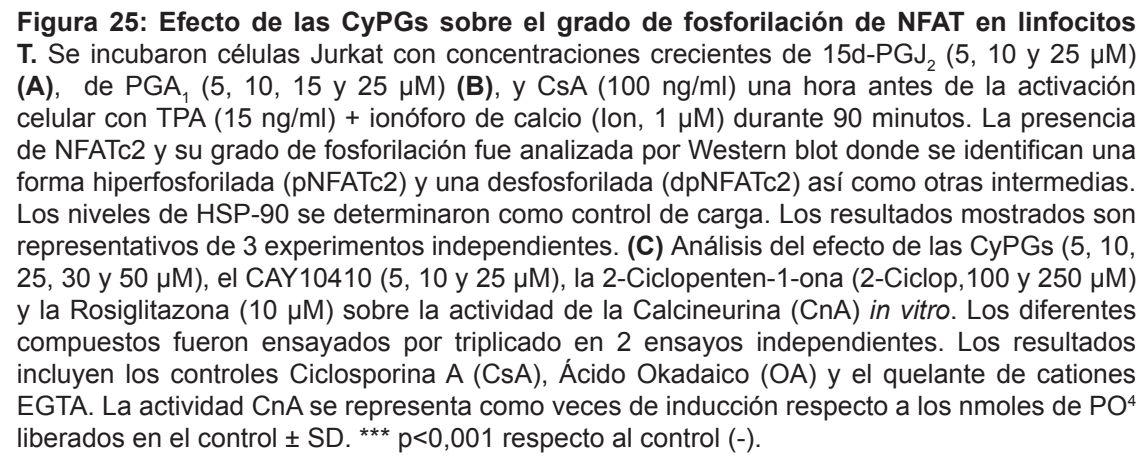


**Figura 24: Análisis de la interferencia de las CyPGs con la actividad transcripcional mediada por NFAT en células T. (A)** Células Jurkat fueron transfectadas con cantidades crecientes de un vector que expresa NFATc2-HA o vector vacío (pCDNA3) como control, e incubadas con distintas concentraciones de 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 µM), o PGA<sub>1</sub> (5, 10 y 15 µM), una hora antes del tratamiento con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 µM). Los datos se representan como la media de % de inducción ± SD, siendo 100% la actividad luciferasa de las células estimuladas con TPA+Ion. **(B)** Se transfectaron células Jurkat con un vector que expresa una forma constitutivamente activa de la calcineurina (pΔCam) o vector vacío (pCDNA3) como control. Las células se incubaron con distintas concentraciones de 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> una hora antes de la estimulación con TPA (15 ng/ml) durante 6 horas. Los resultados se muestran como veces de inducción ( $RLU_{muestra} / RLU_{control}$ ) ± SD. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 respecto a TPA+Ion.

### 3.1. Acciones de las CyPGs sobre la desfosforilación de NFATc2

El factor de transcripción NFAT se encuentra hiperfosforilado en el citosol de células T en reposo. Como se ha mencionado, el aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólicos activa a la fosfatasa calcineurina que desfosforila a NFAT. La exposición de la secuencia de localización nuclear tras la eliminación de los fosfatos conlleva su paso al núcleo donde regula la expresión génica en colaboración con otros factores de transcripción (Gwack et al., 2007). El paso de NFAT al núcleo y por tanto su activación, se impide por la acción de inhibidores de la actividad calcineurina como la ciclosporina A (CsA) (Pan et al., 2013).

Para estudiar si las CyPGs interfieren con el proceso de desfosforilación de NFAT, analizamos la desfosforilación de NFATc2 mediante *Western blot*, dado que cambios en la fosforilación/desfosforilación de NFAT se traducen en cambios en la movilidad electroforética de esta proteína. El tratamiento con TPA+Ion durante 90 minutos indujo un aumento en la movilidad de NFATc2 como consecuencia de la desfosforilación de esta proteína (dpNFATc2). El tratamiento con el inmunosupresor CsA, inhibidor de la actividad calcineurina, mantuvo a NFATc2 en su estado hiperfosforilado aún tras el tratamiento con TPA+Ion (pNFATc2). Por su parte, la incubación con dosis crecientes de 15d-PGJ<sub>2</sub> o de PGA<sub>1</sub> promovió una disminución progresiva de las formas dpNFATc2 coincidiendo con un aumento en la señal de la forma fosforilada (pNFATc2), indicado que estas CyPGs interfieren con el proceso de desfosforilación de NFAT, como uno de los mecanismos de inhibición de la inducción de la actividad transcripcional dependiente de NFAT observada.



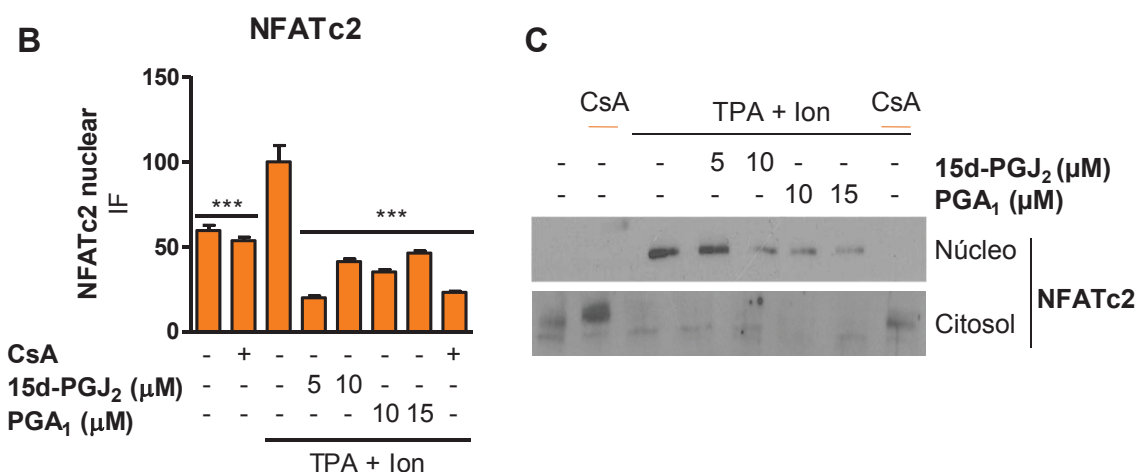
81

En conjunto, estos resultados indican que las CyPGs interfieren parcialmente con la desfosforilación de NFATc2, si bien esta inhibición no se debe a acciones directas sobre la fosfatasa CnA.

### 3.2. Efecto de las CyPGs sobre la translocación al núcleo de NFAT

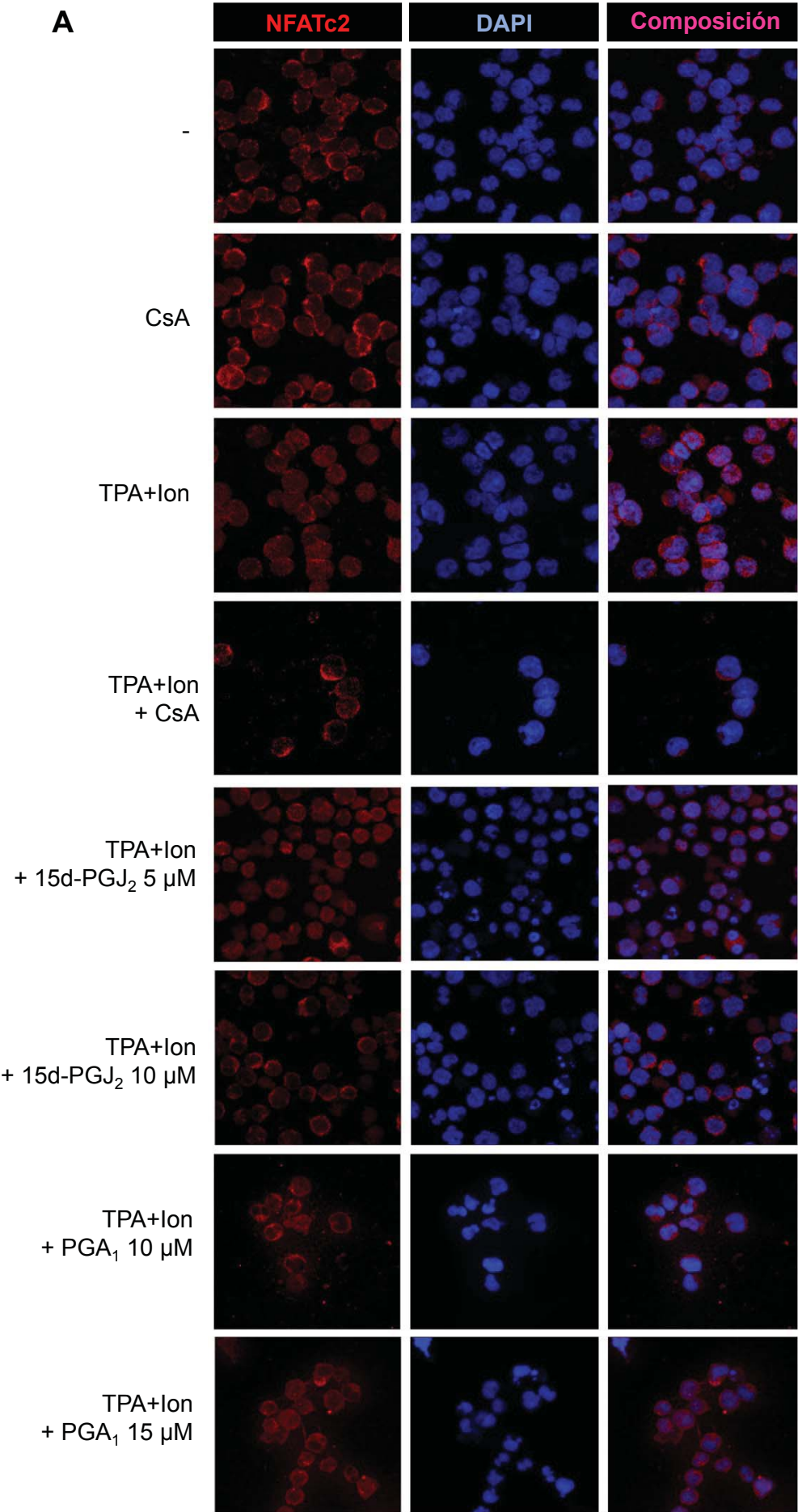
Con el fin de determinar si la inhibición de la desfosforilación de NFATc2 observada se traducía en la disminución del paso de este factor de transcripción al núcleo, analizamos la localización de NFATc2 en células Jurkat tras el tratamiento con CyPGs. Las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia (Figura 26A) así como la cuantificación de NFAT presente en el núcleo (Figura 26B), muestran como, tras el tratamiento con TPA+Ion durante 90 minutos, NFATc2 pasa del citosol, donde se encuentra principalmente en células sin tratar (Control), al núcleo. La administración de CsA previno completamente el paso de NFATc2 al núcleo. Por su parte, la incubación de las células con concentraciones crecientes de 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> en células activadas con TPA+Ion, redujo la presencia de NFATc2 en el núcleo de forma significativa.

Otra evidencia de la interferencia de las CyPGs sobre el paso al núcleo de NFAT se obtuvo mediante ensayos de *Western blot* con extractos nucleares y citosólicos de células Jurkat (Figura 26C). NFATc2 se detectó en el citosol en situación basal, pasando al núcleo tras la activación con TPA+Ion. En presencia de CsA se impidió el paso al núcleo de NFATc2. De forma similar, concentraciones crecientes de 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub>, redujeron la presencia de esta proteína en el núcleo en células tratadas con TPA+Ion.



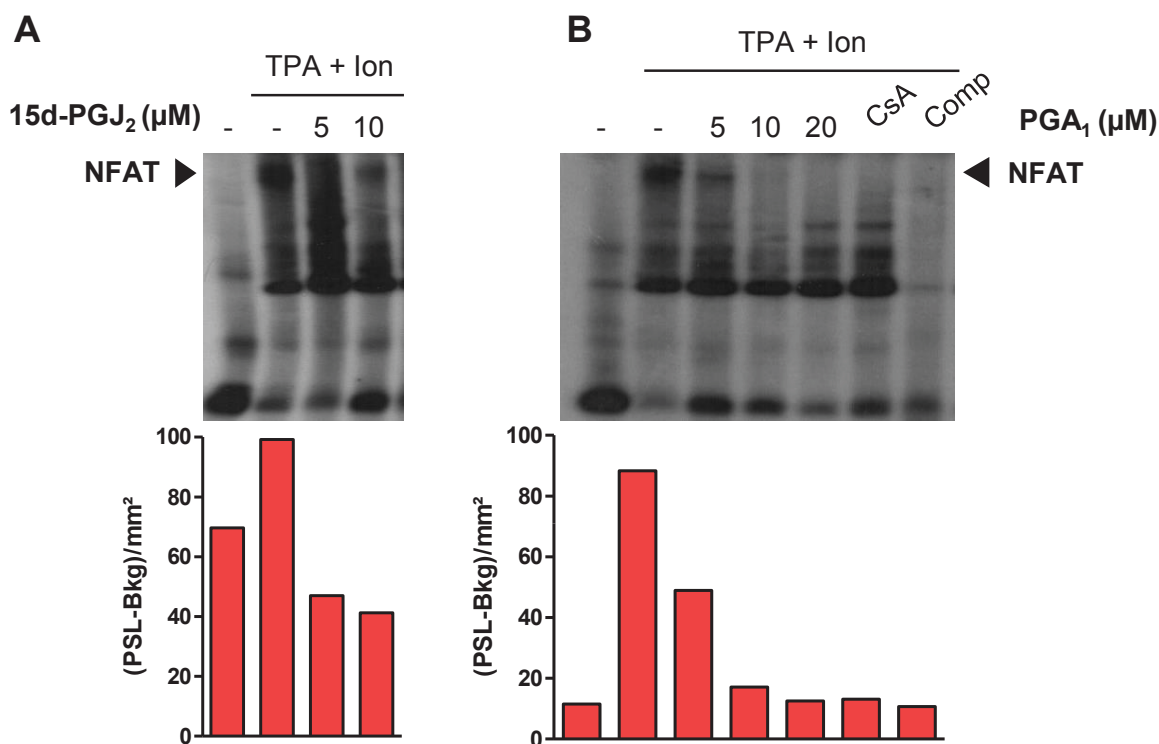
**Figura 26: Efecto de las CyPGs sobre la translocación al núcleo de NFATc2 en linfocitos T.** Células Jurkat incubadas con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM), PGA<sub>1</sub> (10 y 15 μM) una hora antes de su estimulación con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) (TI) durante 90 minutos en presencia o ausencia de Ciclosporina A (CsA, 100 ng/ml). **(A)** en página siguiente) La detección de NFATc2 se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia, con un anticuerpo primario específico que se reveló con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 555 (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La figura muestra imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. **(B)** Análisis de la intensidad de fluorescencia de NFATc2 dentro del núcleo. La gráfica muestra los valores de las medias de intensidad de fluorescencia (IF) ± SD. \*\*\*p<0,001; respecto TPA+Ion. **(C)** Detección mediante *Western blot* de los niveles de NFATc2 en extractos nucleares y citosólicos de células Jurkat tras los diferentes tratamientos.





### 3.3. Efecto de las CyPGs sobre la unión de NFAT al ADN

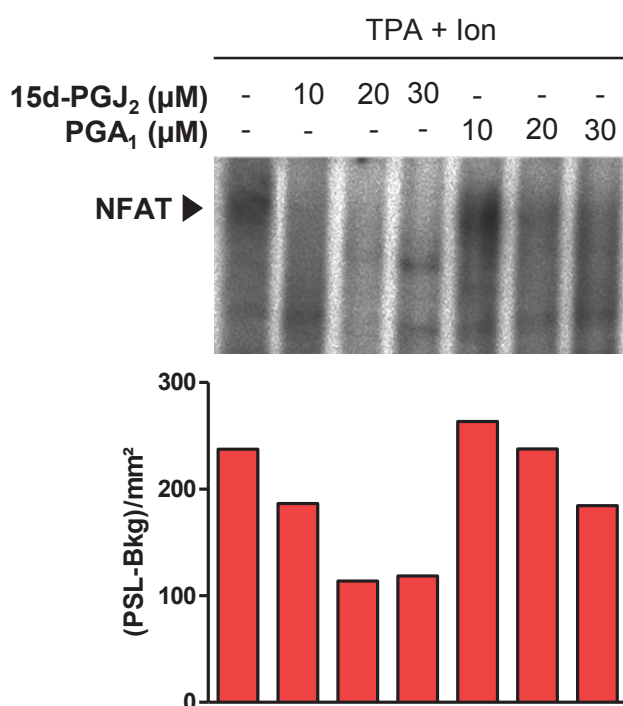
Una vez en el núcleo, NFAT se une al ADN en secuencias específicas presentes en la región promotora de genes diana, para regular su transcripción. La influencia de las CyPGs sobre la unión de NFAT al ADN, se realizó mediante ensayos EMSA a partir de extractos nucleares obtenidos tras lisar células Jurkat sin activar o estimuladas durante 90 minutos con TPA+Ion, incubadas o no con distintas concentraciones de 15d-PGJ<sub>2</sub> (Figura 27A) o PGA<sub>1</sub> (Figura 27B). En estos ensayos se usó una sonda de DNA de doble cadena, marcada con <sup>32</sup>P, que contenía tres copias consecutivas de la secuencia correspondiente al sitio distal de unión de NFAT al promotor de IL-2. Tras la activación celular con TPA+Ion, se produjo un incremento de la unión al ADN de NFAT, la cual disminuyó notablemente tanto en presencia de dosis crecientes de 15d-PGJ<sub>2</sub> como de PGA<sub>1</sub>. Como controles del ensayo, se comprobó el efecto inhibitor de la CsA y la competición con un exceso de sonda no radiactiva.



**Figura 27: Interferencia de las CyPGs con la unión al ADN de NFAT *in vivo*.** Las células Jurkat se trataron con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 μM) (**A**), PGA<sub>1</sub> (5, 10 y 20 μM) (**B**) o Ciclosporina A (CsA, 100 ng/ml), una hora antes de la estimulación con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) durante 90 minutos. Los extractos nucleares se analizaron por EMSA usando una sonda de ADN que contiene elementos de respuesta a NFAT, marcada radiativamente. La especificidad de unión se comprobó añadiendo un exceso del oligonucleótido sin marcar como competidor (Comp). La formación de complejos de retardo se determinó tras la autorradiografía de los geles de acrilamida en los que se resolvieron las muestras. Las gráficas muestran la cuantificación de la señal emitida en cada una de las bandas en dichos geles. El análisis mostrado es representativo de la condición experimental.

Con el fin de determinar si la inhibición por parte de las CyPGs de la unión de NFAT al ADN requería del tratamiento de las células antes de obtener los extractos o también ocurría *in vitro*, se analizó el efecto de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y la PGA<sub>1</sub> sobre la unión al ADN de NFAT en extractos obtenidos de células activadas con TPA+Ion y sin tratamiento previo con estas CyPGs. Se incubaron 5 µg de extracto nuclear con concentraciones crecientes de 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> durante una hora antes de añadir la sonda radiactiva de ADN con los elementos de unión de NFAT y resolver en un gel de acrilamida. Los resultados obtenidos, así como la cuantificación de la señal obtenida (Figura 28), muestran que la unión al ADN inducida por el combinado TPA+Ion se inhibió en presencia de cantidades crecientes de 15d-PGJ<sub>2</sub> y de PGA<sub>1</sub> en extractos nucleares tratados *in vitro*.

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que la inhibición producida por las CyPGs de la actividad transcripcional mediada por NFAT tras la activación de linfocitos T se debe, tanto a la interferencia con la desfosforilación como con su paso al núcleo, así como a interacciones directas, que interfieren con la unión de este factor de transcripción a sus secuencias diana en el ADN.



**Figura 28: Interferencia de las CyPGs con la unión al ADN de NFAT *in vitro*.** Las células Jurkat se trataron con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 µM) durante 90 minutos. Los extractos nucleares obtenidos se trataron con 15d-PGJ<sub>2</sub> (5 y 10 µM) o PGA<sub>1</sub> (5, 10 y 20 µM) durante 60 min, tras lo cual se analizaron por EMSA usando una sonda de DNA contenido elementos de respuesta a NFAT, marcada radiactivamente. La formación de complejos de retardo se determinó tras la autoradiografía de los geles de acrilamida en los que se resolvieron las muestras. Las gráficas muestran la cuantificación de la señal emitida en cada una de las bandas en dichos geles. El análisis mostrado es representativo de la condición experimental.

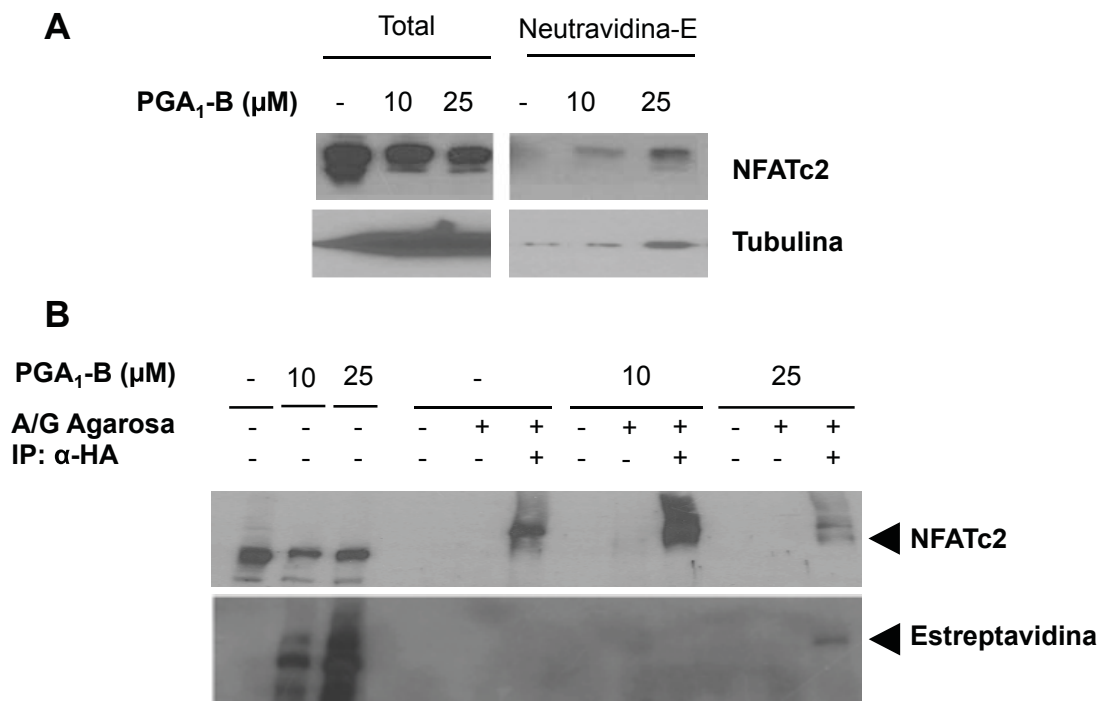
### 3.4. Estudio de la interacción de las CyPGs con NFAT *in vivo*

A la vista de los resultados anteriores, nos planteamos la posibilidad de que las acciones de estas prostaglandinas se podrían deber a interacciones directas entre NFAT y las CyPGs, tal y como se ha descrito en algunos tipos celulares para los factores de transcripción AP-1 y NF-κB.

Para llevar a cabo este estudio, empleamos análogos biotinilados de las CyPGs (15d-PGJ<sub>2</sub>-B, PGA<sub>1</sub>-B). La adición de la molécula de biotina a la prostaglandina impide la acción de este compuesto a través de su unión a PPARγ (Garzón et al., 2010) y permite la



detección o el aislamiento de proteínas unidas a las CyPGs. Basándonos en la capacidad para identificar interacciones CyPG-proteína a través del uso de estos análogos biotinilados, quisimos determinar en primer lugar si una de las proteínas a la que se estaba uniendo la  $PGA_1$  era NFAT. Para ello, se transfectaron células HEK293 con un vector que expresa NFATc2 unido al epítipo HA, e incubamos las células con  $PGA_1$ -B (10 y 25  $\mu$ M), tras lo cual se obtuvieron extractos celulares. En estos extractos se procedió a la elución, con una resina de neutravidina, de las proteínas que estaban interaccionando con la  $PGA_1$ -B. El análisis de los eluidos mediante *Western blot* con anticuerpos específicos, permitió identificar a NFATc2 como una de las proteínas biotiniladas, indicando la unión de  $PGA_1$ -B a este factor de transcripción. Su presencia en el eluido se incrementó con el aumento en la cantidad de  $PGA_1$ -B usada. Como control se muestra la señal obtenida en los eluidos, con anticuerpos anti-tubulina, una proteína cuya interacción con la  $PGA_1$  ha sido descrita con anterioridad (Figura 29A) (Gharbi et al., 2007).

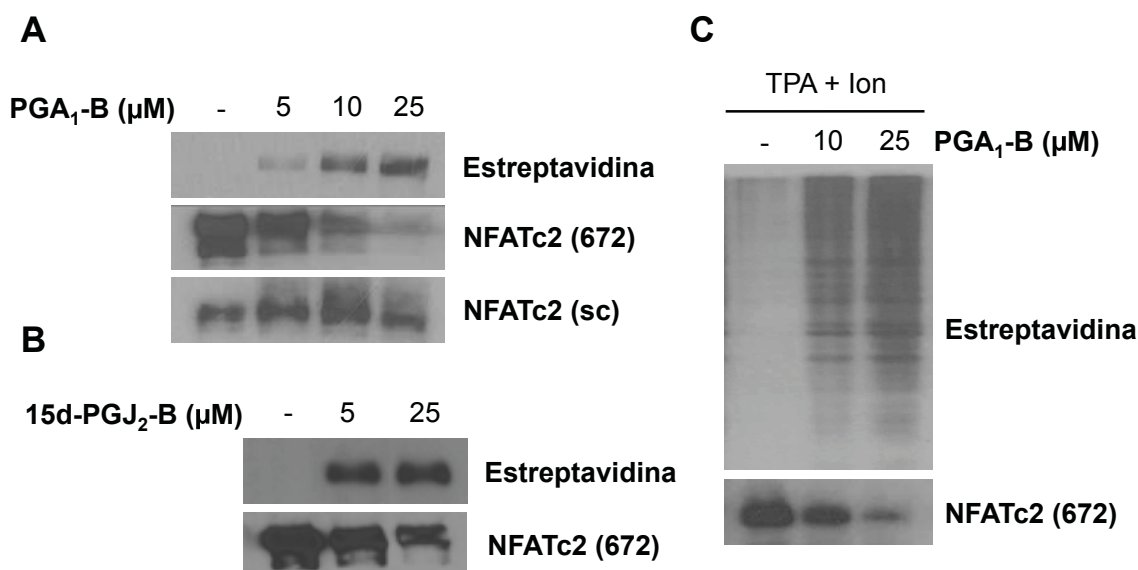


**Figura 29: Análisis de la unión de  $PGA_1$  a NFATc2 *in vivo*.** Células HEK 293 transfectadas con el plásmido NFATc2-HA se incubaron durante 2 horas con  $PGA_1$ -Biotinilada (10 y 25  $\mu$ M). **(A)** Los extractos celulares totales o eluidos tras la incubación con una resina de neutravidina para seleccionar las proteínas biotiniladas que se unen a la biotina, se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos frente a NFATc2. **(B)** Los inmunoprecipitados de HA-NFATc2 mediante el uso de un anticuerpo  $\alpha$ -HA se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se determinó la presencia de NFATc2 mediante el uso del anticuerpo  $\alpha$ -NFATc2(672). El revelado de proteínas modificadas por la  $PGA_1$ -B se llevó a cabo mediante el uso de Estreptavidina-HRP. La presencia de Tubulina se determinó como control, al tratarse de una proteína a la cual se une  $PGA_1$ -B. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos diferentes

Esta interacción *in vitro* entre NFATc2 y  $\text{PGA}_1\text{-B}$  se confirmó mediante ensayos de inmunoprecipitación en los extractos de las células HEK293 transfectadas con el plásmido NFATc2-HA e incubadas con  $\text{PGA}_1\text{-B}$ . NFATc2-HA fue inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-HA y los inmunoprecipitados obtenidos se analizaron por *Western blot* junto a los controles adecuados. La incubación con un anticuerpo anti-NFATc2 reveló la presencia de este factor de transcripción de forma específica tan sólo en los extractos incubados con anti-HA, tanto en extractos de células incubadas con  $\text{PGA}_1\text{-B}$  como en ausencia de ésta. El análisis de la presencia de proteínas biotiniladas mediante el revelado con estreptavidina, permitió detectar una banda compatible con la presencia de NFATc2 en los inmunoprecipitados de extractos incubados con  $\text{PGA}_1\text{-B}$  (25  $\mu\text{M}$ ) (Figura 29B).

### 3.5. Estudio del mecanismo de inhibición de NFATc2 *in vitro*

Tras comprobar la interacción entre  $\text{PGA}_1$  y NFATc2 en células vivas, procedimos a estudiar en detalle la especificidad de esta interacción mediante ensayos *in vitro* con proteína NFATc2 purificada, en presencia tanto de  $\text{PGA}_1$  como de 15d-PGJ<sub>2</sub>. La incubación de NFATc2 con concentraciones crecientes de  $\text{PGA}_1\text{-B}$  o 15d-PGJ<sub>2</sub>-B y el posterior revelado con estreptavidina permitió determinar la unión de las CyPGs biotiniladas a NFATc2 de manera dependiente de la concentración (Figuras 30A y 30B). Sorprendentemente, la señal obtenida tras el revelado con un anticuerpo anti-NFATc2 (672), disminuyó de forma inversamente proporcional a la cantidad de CyPG biotinilada usada en las incubaciones. El revelado de estos filtros con un anticuerpo anti-NFATc2 (sc) que reconoce otro epítipo distinto al que se une el anticuerpo previamente utilizado, permitió determinar que la disminución de la señal observada en el primer caso no se correspondía con una disminución en la cantidad de NFATc2 usada en estos ensayos. Con el fin de comprobar si la disminución de la señal de NFATc2 con el anticuerpo 672 ocurría no sólo en los ensayos con la proteína purificada, se obtuvieron extractos nucleares de células Jurkat estimuladas con TPA+Ion, que se incubaron con cantidades crecientes de  $\text{PGA}_1\text{-B}$ . El revelado con estreptavidina del *Western blot* de estos extractos mostró el incremento proporcional a la concentración de  $\text{PGA}_1$ , de la señal correspondiente a proteínas biotiniladas. Al igual que lo observado en el caso de la proteína NFATc2 purificada, la señal de NFATc2 obtenida tras el revelado con el anticuerpo anti-NFATc2 (672) en estos extractos disminuyó al aumentar la concentración de  $\text{PGA}_1\text{-B}$  (Figura 30C). Estos resultados sugieren la interferencia entre el sitio de reconocimiento en NFATc2 para la unión del anticuerpo NFATc2 (672) y la presencia de CyPGs biotiniladas unidas a esta proteína.



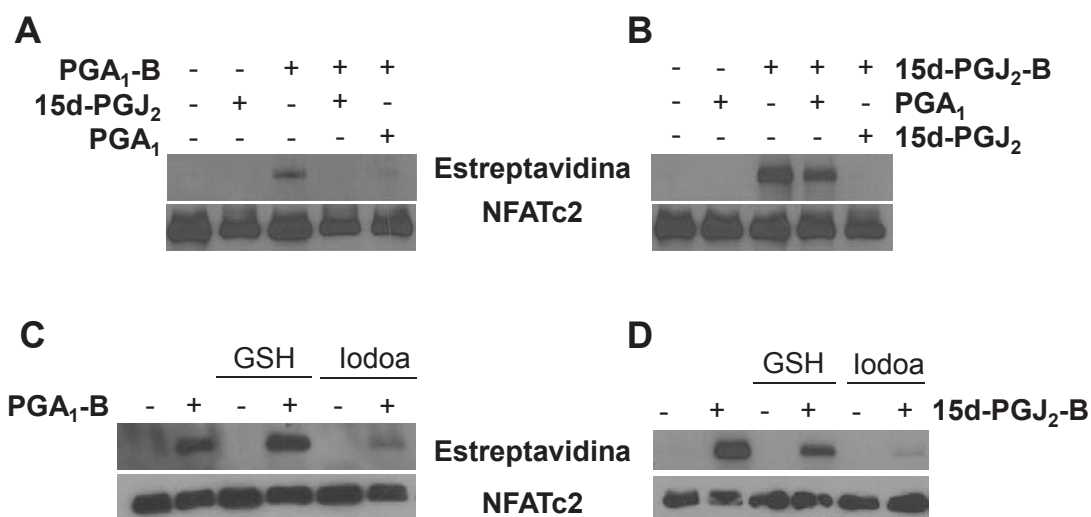
**Figura 30: Análisis de la unión de las CyPGs a NFATc2 *in vitro*.** (A) 5 μg de proteína NFATc2 se incubaron con CyPGs biotiniladas, PGA<sub>1</sub>-B (5, 10 y 25 μM) o (B) 15d-PGJ<sub>2</sub>-B (5 y 25 μM) durante 1 hora. (C) Un mismo volumen de extracto nuclear de células Jurkat estimuladas con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 μM) durante 90 minutos se incubó durante una hora con PGA<sub>1</sub>-B a las concentraciones de 10 ó 25 μM. Los complejos NFAT-CyPGs-biotiniladas fueron analizados mediante *Western blot*. La unión de la CyPG-B se determinó mediante el uso de Estreptavidina-HRP y la determinación de los niveles de NFATc2 se llevó a cabo mediante el uso de los anticuerpos primarios anti-NFATc2 (672) o anti-NFATc2 (sc).

La especificidad y características de la unión de las CyPGs biotiniladas a NFATc2 se determinó mediante diferentes ensayos. Como se muestra en la figura 31A la incubación con un exceso de PGA<sub>1</sub> o 15dPGJ<sub>2</sub> no biotiniladas fue capaz de competir eficientemente con la unión de PGA<sub>1</sub>-B, disminuyendo de forma notable la señal obtenida tras el revelado con estreptavidina. En el caso de la unión de 15d-PGJ<sub>2</sub>-B, la competición con la propia 15dPGJ<sub>2</sub> fue más eficiente que la PGA<sub>1</sub> (Figura 31A y 31B).

Diversos trabajos han puesto de manifiesto la influencia de la actividad Glutación S transferasa (GST) y de los niveles de glutatión (GSH) celular sobre los efectos biológicos de las CyPGs. De hecho, la 15d-PGJ<sub>2</sub> puede reaccionar covalentemente *in vitro* con los grupos tioles de GSH (Gayarre et al., 2005). Como se muestra en las figuras 31C y 31D, la preincubación *in vitro* de NFATc2 con GSH, 2 mM antes del tratamiento con CyPGs biotiniladas, no parece interferir con la unión de PGA<sub>1</sub>-B a NFATc2. Sin embargo, la unión de 15 dPGJ<sub>2</sub>-B a este factor de transcripción disminuyó de forma significativa en presencia de GSH, dando idea de la competición de GSH con NFATc2 por la unión de esta CyPG.

Por otro lado, se llevó a cabo un experimento de competición *in vitro* en presencia de iodoacetamida (2 mM), preincubando la proteína NFATc2 en presencia o ausencia de este compuesto, antes de tratar con las CyPGs biotiniladas. Tras el análisis mediante *Western blot* y el revelado con estreptavidina, se observó una reducción de la unión a

NFATc2, tanto de  $\text{PGA}_1$ -B como de 15d-PGJ<sub>2</sub>-B, como consecuencia del pretratamiento con Iodoacetamida. Dado que la Iodoacetamida es un reactivo capaz de unirse de forma covalente a las cisteínas libres de las proteínas, impidiendo así la unión de las CyPGs, estos resultados refuerzan las evidencias obtenidas acerca de la unión covalente a NFATc2 de  $\text{PGA}_1$  y 15d-PGJ<sub>2</sub>-B a través de residuos de cisteína. Esto pudiera dar idea del mecanismo de acción por el cual se produce la interferencia de las CyPGs estudiadas sobre la activación transcripcional mediada por NFAT.



**Figura 31: Unión de las CyPGs a NFATc2: ensayos de competición.** 5  $\mu\text{g}$  de extracto de NFATc2 fueron incubados durante 60 minutos con vehículo,  $\text{PGA}_1$  o 15d-PGJ<sub>2</sub> 1 mM, glutatión (GHS, 2 mM) o Iodoacetamida (Iodoa, 2 mM) según se indica en cada figura, antes de añadir las CyPGs biotiniladas,  $\text{PGA}_1$ -B (5  $\mu\text{M}$ ) (**A y C**) o 15d-PGJ<sub>2</sub>-B 1  $\mu\text{M}$  (**D**) ó 5  $\mu\text{M}$  (**B**). En ensayos de *Western blot* se determinó la unión de las CyPGs biotiniladas mediante el revelado con Estreptavidina-HRP. Los niveles de NFATc2 se detectaron con el uso del anticuerpo NFATc2 (672).



## DISCUSIÓN

---



El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el estudio de las acciones de dos CyPGs, la 15d-PGJ<sub>2</sub> y la PGA<sub>1</sub>, sobre la activación de células T a diferentes niveles, incluyendo el análisis de las vías de señalización implicadas en dichas acciones. Estudios previos han abordado el papel de las CyPGs en células del sistema inmune, centrados fundamentalmente en las acciones anti-inflamatorias de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre macrófagos y células dendríticas. En esta tesis doctoral se ponen de manifiesto nuevos aspectos acerca de las acciones tanto de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, como de la PGA<sub>1</sub>, en linfocitos T, células esenciales en la respuesta inmune adaptativa.

### 1. Las CyPGs inhiben la proliferación de las células T

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral ponen de manifiesto, a través de diferentes evidencias, un efecto inhibitorio de las CyPGs sobre la proliferación que tiene lugar tras la activación de los linfocitos T. Por un lado, la inducción de la expresión en membrana del marcador de activación CD71 (receptor de transferrina) que ocurre tras la activación, se vio reducida de forma sustancial en presencia tanto de 15d-PGJ<sub>2</sub>, como de la PGA<sub>1</sub>. CD71 es un receptor de superficie necesario para el transporte de hierro, que se regula positivamente en células que proliferan 24-48 horas después de la activación, con una expresión incrementada en linfocitos T que se mantiene durante varios días (Reddy et al., 2004; Shipkova y Wieland, 2012). Además de la inhibición de la inducción de la expresión de CD71, el tratamiento con estas CyPGs afectó también de forma negativa a la expresión de IL-2, citoquina necesaria para la expansión de los linfocitos T (Boyman y Sprent, 2012). Estos resultados se acompañan de la observación directa de una disminución de la proliferación de los linfocitos T, inducida tras la activación del complejo TCR/CD3 con el cóctel de anticuerpos  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28. Junto a la expresión de CD71 se analizó la de CD69, un marcador temprano de activación de linfocitos T (Sancho et al., 2005), observándose que la inducción de su expresión en membrana no se vio alterada de forma significativa por ninguna de las CyPGs a las dosis estudiadas, dando valor a la especificidad del efecto sobre la expresión en membrana de CD71.

Trabajos realizados en células tumorales así como estudios *in vivo*, han descrito tanto acciones anti-proliferativas como pro-apoptóticas de las CyPGs, poniendo de manifiesto el interés del uso de estos compuestos como agentes anti-tumorales. Diferentes mecanismos se han propuesto para explicar sus acciones anti-proliferativas: el bloqueo de la progresión del ciclo celular (Kamagata et al., 2007), la activación de la vía apoptótica mitocondrial (Nencioni et al., 2003), la inducción de estrés oxidativo (Chen et al., 2005) o la inhibición de NF- $\kappa$ B y activación de la ruta de las MAPKs (Castrillo et al., 2003; Koyani et al., 2014), entre otros. Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la divergencia entre ambas CyPGs en cuanto a su capacidad para inducir apoptosis en células Jurkat o en linfocitos T humanos aislados de sangre de donantes. Así, mientras que la 15d-PGJ<sub>2</sub> actúa como un potente inductor de apoptosis en la línea celular de leucemia T Jurkat, con apenas efecto en PBLs o linfocitos T humanos, en ningún caso se observó un efecto apoptótico de la PGA<sub>1</sub> a concentraciones equivalentes en ninguno de los tipos celulares usados. La apoptosis de células T es un proceso necesario tanto para la homeostasis



como para la resolución de la respuesta inmune, hecho que iría en consonancia con la participación de la 15d-PGJ<sub>2</sub> durante el período de resolución de la inflamación, induciendo apoptosis de células del sistema inmune (Castrillo et al., 2003; Hortelano et al., 2000; Rajakariar et al., 2007). Nuestros resultados ponen de manifiesto que, en ausencia de activación celular, la 15d-PGJ<sub>2</sub> incrementa notablemente la apoptosis de células Jurkat de forma dependiente de la concentración, hecho que va en consonancia con lo descrito por Kanunfre y colaboradores en esta línea celular y en células Raji, que muestran que estos efectos tiene lugar a través de la activación de la vía mitocondrial (Kanunfre et al., 2004). Algunos autores han descrito que las acciones pro-apoptóticas de la 15d-PGJ<sub>2</sub> en células T pueden tener lugar a través de su unión a PPAR $\gamma$  (Harris y Phipps, 2001) o activando la vía mitocondrial (Nencioni et al., 2003). Las concentraciones de 15d-PGJ<sub>2</sub> utilizadas en esta tesis doctoral (5 a 10  $\mu$ M) estarían en el rango utilizado en estudios *in vitro* y en el umbral más bajo del utilizado en estudios de apoptosis, donde se llega hasta 50  $\mu$ M (Kamagata et al., 2007; Liu et al., 2005; Nencioni et al., 2003; Pacienza et al., 2010). Entre los mecanismos descritos para la inducción de apoptosis por CyPGs se incluye el aumento en la producción de ROS (Kondo et al., 2001; Shin et al., 2009). Hoy en día está claramente establecida la relación entre las CyPGs y sus efectos sobre la alteración del estado redox celular (Oeste y Perez-Sala, 2014). Nuestros resultados muestran un aumento en la producción de ROS en células Jurkat en respuesta al tratamiento, tanto con 15d-PGJ<sub>2</sub> como con PGA<sub>1</sub>, ya fuera en células en estado basal o tras la estimulación con TPA+Ion. De tal manera, a falta de determinar si hay una relación directa entre los efectos comunes observados con ambas CyPGs sobre la disminución de la proliferación celular y el aumento en la producción de ROS, descartamos que este mecanismo sea la causa del efecto propio de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y no de la PGA<sub>1</sub>, sobre la inducción de apoptosis en células Jurkat. De manera adicional, el efecto inhibitorio común sobre la proliferación de células T podría deberse a las acciones de estas CyPGs sobre el ciclo celular. Es sabido que p21 inhibe la progresión a través del ciclo celular en condiciones de daño oxidativo (O'Reilly, 2004), habiéndose descrito que la 15d-PGJ<sub>2</sub> bloquea, en algunos tipos celulares, las transiciones G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M a través de la inhibición de la expresión de las Ciclinas D1 y B1 (Kamagata et al., 2007) y la inducción de la expresión de p21 (Han et al., 2004). La inhibición de la proliferación celular mediada por PGA<sub>1</sub> también se ha relacionado, entre otros mecanismos, con el bloqueo de la transición G<sub>1</sub>/S del ciclo celular a través de alteraciones en la expresión de proteínas reguladoras, inhibiendo la actividad de Ciclinas, y de las CDKs e incrementando la expresión de p21 (Tanikawa et al., 1998). Por otro lado, en líneas celulares de leucemia como serían las células Jurkat, la 15d-PGJ<sub>2</sub> puede desencadenar la apoptosis a través de la inducción de la expresión de Bax o la inhibición de los niveles de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Liu et al., 2005). Serían necesarios por tanto estudios adicionales para determinar si las CyPGs tienen acciones diferenciales sobre la expresión o actividad de proteínas implicadas en la progresión del ciclo o de la supervivencia celular. Nuestros resultados ponen de manifiesto diferencias en cuanto a los efectos pro-apoptóticos de la 15d-PGJ<sub>2</sub> entre células primarias y la línea celular Jurkat, indicando por un lado, que las acciones descritas en esta tesis no son consecuencia de un efecto tóxico general de esta dienona,

y por el otro, que sus acciones pro-apoptóticas serían selectivas de células transformadas, si bien se requieren más estudios en otros tipos celulares para sostener esta afirmación. Los resultados obtenidos irían en consonancia con lo observado por Harris y Phipps, que ven restringidas las acciones pro-apoptóticas de la 15d-PGJ<sub>2</sub> a células tumorales (Harris y Phipps, 2002).

En general, las acciones de las CyPGs pueden tener lugar tanto por mecanismos dependientes de su unión al PPAR $\gamma$ , como de forma independiente de sus propiedades como ligandos de este receptor (Straus y Glass, 2001). De tal manera, algunas de las acciones pro-apoptóticas y anti-proliferativas mediadas por la 15d-PGJ<sub>2</sub> tendrían lugar a través de su unión al receptor nuclear PPAR $\gamma$ , ya que son reproducidas por ligandos sintéticos del mismo (Lin et al., 2007; Liu et al., 2005; Yang et al., 2000). El análisis de la expresión y funcionalidad del receptor PPAR $\gamma$  en nuestros sistemas celulares de estudio, permitió detectar bajos niveles de expresión de este receptor tanto en la línea celular Jurkat como en las células primarias obtenidas de sangre de donantes. Por su parte, el análisis de la capacidad de diferentes ligandos de PPAR $\gamma$ , entre los que se incluyen las CyPGs PGA<sub>1</sub> y 15d-PGJ<sub>2</sub>, para activar a este receptor nuclear en células Jurkat, puso de manifiesto que es necesaria la sobre-expresión de un PPAR $\gamma$  exógeno en estas células para observar la inducción de la transcripción dependiente de elementos de respuesta a PPAR $\gamma$ . Esto indicaría que el receptor endógeno no es funcional o suficiente para llevar a cabo dichas acciones, tal y como se ha puesto de manifiesto en otros trabajos en este tipo celular (Cippitelli et al., 2003; Cunard et al., 2004; Fionda et al., 2007; Yang et al., 2000).

De tal manera, en consonancia a lo observado en los resultados obtenidos en células Jurkat y en células T primarias a lo largo de esta tesis en cuanto a las acciones de las CyPGs sobre la regulación de la expresión génica, nos lleva a interpretar que las acciones de ambas CyPGs sobre la proliferación celular, tendrían lugar por mecanismos independientes de su unión a PPAR $\gamma$ .

## **2. Las CyPGs inhiben la migración de las células T inducida por SDF-1 $\alpha$**

Nuestros resultados muestran un efecto inhibitorio de las CyPGs estudiadas sobre la capacidad de migración en respuesta a la quimioquina SDF-1 $\alpha$ , tanto en células Jurkat como en los linfocitos T humanos primarios. Las quimioquinas y sus receptores son importantes reguladores de la homeostasis de los linfocitos así como del tráfico celular a los órganos linfoides, pero también son mediadores en condiciones patológicas de inflamación y autoinmunidad, participando en el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis (Kryczek et al., 2007; Turner et al., 2014). La migración de células del sistema inmune es un proceso regulado y necesario para el correcto funcionamiento de la inmunidad innata y adaptativa. La quimioquina SDF-1 $\alpha$  a través de su unión al receptor CXCR4, juega un papel importante en la migración de las células del sistema inmune, participando en la hematopoyesis y en la progresión del proceso inflamatorio, además de en otros procesos (Nagasawa, 2015). Un aspecto relevante del estudio de la inhibición de esta vía tendría que ver también con la reducción de la invasividad tumoral, dada la participación de la ruta

de señalización SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 en la dispersión de tumores sólidos y hematológicos (de Lourdes Perim et al., 2015; Teicher y Fricker, 2010). Si bien no existen estudios relevantes acerca del efecto de las CyPGs en la migración de linfocitos T, diversos trabajos han descrito la inhibición por parte de la 15d-PGJ<sub>2</sub> de la migración de células del sistema inmune como monocitos (Han et al., 2012), neutrófilos (Napimoga et al., 2008) y eosinófilos (Farnesi-de-Assuncao et al., 2012). De manera adicional, se ha descrito la inhibición de la migración de células musculares lisas vasculares o tumorales a través de la unión de la 15d-PGJ<sub>2</sub> al receptor nuclear PPAR $\gamma$  (Goetze et al., 1999; Richard y Blay, 2008).

Nuestros resultados indican que los efectos de las CyPGs o sus análogos sobre migración de las células T no tienen lugar a través de la inducción de cambios en la expresión del receptor CXCR4 ni sobre la internalización del mismo. Otros autores han descrito que la 15d-PGJ<sub>2</sub>, así como ligandos sintéticos de PPAR $\gamma$ , reducen la migración de células de cáncer de colon inhibiendo la expresión de CXCR4 (Richard y Blay, 2008). La ausencia de efectos a través de PPAR $\gamma$  en nuestras células de estudio justificaría estas diferencias, aunque el CAY10410, ligando sintético de este receptor nuclear muestra un ligero efecto inhibitorio sobre la migración de células T. Si bien no podemos descartar por completo la mediación de PPAR $\gamma$  en estos efectos, sugerimos que las acciones de las CyPGs y sus análogos sobre la migración de células T en respuesta a SDF-1 $\alpha$  podrían ser llevadas a cabo, en el caso de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, la PGA<sub>1</sub> y la 2-Ciclopenten-1-ona a través del grupo electrófilo presente en el anillo, y en que el grupo electrófilo presente en una de las cadenas del CAY10410, también presente en la dienona, podría ser responsable de mediar también cierta inhibición.

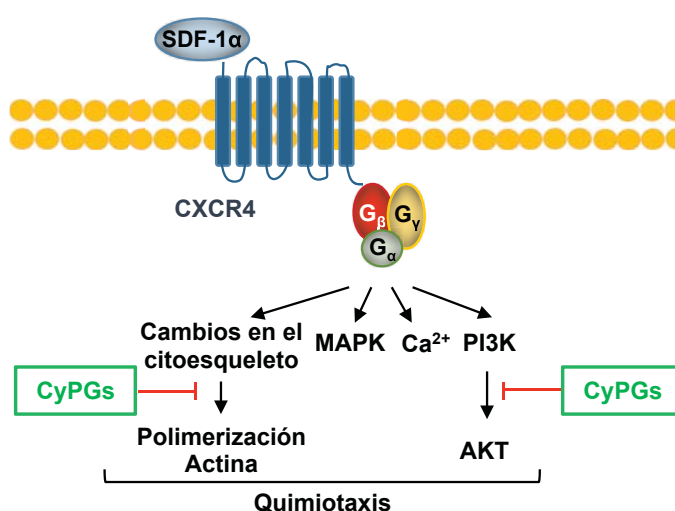
La unión de SDF-1 $\alpha$  a CXCR4, receptor asociado a proteínas G heterotriméricas, produce la disociación del complejo G $_{\alpha}$ -G $_{\beta\gamma}$ . La señalización a través de esta vía suele estar asociada a G $_{\alpha i}$ , la cual inhibe la actividad Adenilato ciclasa y activa la ruta de MAPK/PI3K. Por otro lado, el complejo G $_{\beta\gamma}$  activa a la Fosfolipasa C (PLC) produciendo un incremento en los niveles de calcio intracelular. La desensibilización del receptor se produce por endocitosis de éste, proceso que requiere el reclutamiento de la  $\beta$ -Arrestina (Doring et al., 2014; Ganju et al., 1998; Teicher y Fricker, 2010). El estudio de las rutas de señalización activadas tras la unión de la quimioquina al receptor CXCR4 indica que la movilización de calcio intracelular no se ve afectada por la presencia de las CyPGs o sus análogos. Tampoco se ve inhibida en presencia de las CyPGs, la activación de las MAPKs, en tanto que no disminuyen los niveles de fosforilación de ERK y JNK.

La activación de PI3K es un paso esencial en la migración de linfocitos T en respuesta a quimioquinas. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la fosforilación de AKT en respuesta a SDF-1 $\alpha$ , indicativo de un incremento de la actividad PI3K tras la unión de la quimioquina al receptor CXCR4. En presencia de las CyPGs, los niveles de AKT fosforilado (pAKT) disminuyen, lo que podría influir en la respuesta migratoria de estas células (Figura D1). Si bien no hay estudios a este respecto en células T, la inhibición por 15d-PGJ<sub>2</sub> de la inducción de la vía PI3K/Akt mediada por otros estímulos como el LPS, ha sido descrita en otros tipos celulares como en astrocitos de rata (Giri et al., 2004) o en la línea celular

osteoblástica MC3T3E-1 (Jung et al., 2009).

Además de PI3K y MAPKs, en el proceso migratorio participan GTPasas como H-Ras, Rho o Rac1, que, entre otras acciones, participan en la reorganización del citoesqueleto, necesaria para su migración en respuesta al gradiente de quimioquinas (Devreotes y Horwitz, 2015; Hanna y El-Sibai, 2013). Es importante tener en cuenta en estos efectos la modificación de Rac1 por 15d-PGJ<sub>2</sub>, la cual forma un aducto con esta proteína que tiene como resultado la inhibición de la migración en células endoteliales (Wall et al., 2015).

La formación de Actina filamentosa (F-Actina) en linfocitos T es un mecanismo importante en la polarización durante la migración celular (Serrador et al., 1999). Nuestros resultados muestran una reducción significativa en presencia de las CyPGs, de la inducción por SDF-1 $\alpha$  de los niveles de  $\beta$ -Actina polimerizada en forma de F-Actina (Figura D1), que puede ser debida a la inhibición de las rutas responsables de la reordenación del citoesqueleto. Estudios previos han descrito la modificación covalente de proteínas del citoesqueleto como la propia  $\beta$ -Actina, por parte de las CyPGs en células de neuroblastoma o células mesangiales (Aldini et al., 2007; Stamatakis et al., 2006) y su influencia en la formación de F-Actina (Diers et al., 2010; Gayarre et al., 2006). Otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto como la Vimentina o la Tubulina también son dianas de modificaciones covalentes por parte de la 15d-PGJ<sub>2</sub> (Stamatakis et al., 2006; Cocca et al., 2009).



**Figura D1: Modelo de las acciones inhibitoras de las CyPGs sobre la migración inducida por SDF-1 $\alpha$  en células T activadas.** La unión de la quimioquina SDF-1 $\alpha$  al receptor CXCR4 activa, a través de proteínas G heterotriméricas, distintas rutas de señalización tales como la de la Fosfolipasa C que incrementa los niveles de calcio intracelular, la activación de las MAPK y la activación de la vía PI3K, así como la internalización del receptor. Las CyPGs, 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub>, no afectan a la internalización de CXCR4, la señalización mediada por calcio o la vía de las MAPK, e inhiben la vía PI3K, necesaria para la reorganización del citoesqueleto de los linfocitos T, y por tanto para su migración en respuesta al gradiente de quimioquinas.

La regulación de la expresión de moléculas clave en el proceso migratorio como las quimioquinas o sus receptores, es también un elemento necesario en la modulación de la respuesta migratoria de células del sistema inmune (Griffith et al., 2014). Entre los diferentes genes cuya expresión se ve afectada en células T como consecuencia del tratamiento con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> se encuentran diversas quimioquinas y receptores (Tablas S2-S4). Aun cuando quedaría por determinar la relevancia de estos cambios sobre la migración celular,

son varios los trabajos que han mostrado la influencia de las CyPGs sobre la expresión de quimioquinas en diferentes tipos celulares, ya sea con efectos inhibitorios o aumentando la migración, como en el caso de la inducción de IL-8 como quimioatrayente de neutrófilos (Rovin et al., 2001; Zhang et al., 2001).

### 3. Acciones de las CyPGs sobre la expresión génica

Una de las principales acciones de las CyPGs tiene que ver con su capacidad para regular la expresión génica. La 15d-PGJ<sub>2</sub> se produce en el foco inflamatorio coincidiendo con un repunte de la expresión de COX-2 (Gilroy et al., 1999) contribuyendo así a la resolución de la inflamación a través de la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de diferentes tipos celulares. De tal manera, la inhibición de la inducción de genes pro-inflamatorios es un hecho esencial en las acciones anti-inflamatorias de la 15d-PGJ<sub>2</sub> descritas hasta la fecha (Azuma et al., 2001; Chung et al., 2003; Ricote et al., 1998; Yang et al., 2000). En esta tesis doctoral se analizan los efectos de las CyPGs 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> sobre la expresión de 96 genes, seleccionados por su papel en la respuesta inmune y la inflamación expresados en células T. Destacan las diferencias observadas en presencia de una u otra CyPG, encontrando, además de genes que se ven afectados por ambas CyPGs en un mismo sentido, otros no comunes que responden de diferente manera al tratamiento con una u otra CyPG. Esto indicaría por un lado, que los efectos de las CyPGs sobre la expresión génica no son debidos a acciones generalizadas en la célula, y por el otro ponen de manifiesto diferencias en cuanto a los efectos de estas dos CyPGs sobre las células T, coincidiendo con trabajos previos que han descrito diferencias en cuanto a la reactividad de ambas CyPGs (Gayarre et al., 2005; Renedo et al., 2007).

Entre los genes analizados decidimos centrarnos en el estudio en detalle de genes implicados en la respuesta inmune, cuya expresión se ve inducida tras la activación de las células T tales como citoquinas, o proteínas como COX-2 que participa en la síntesis de prostanoïdes y por tanto de las propias CyPGs. Nuestros resultados ponen de manifiesto que dosis crecientes de PGA<sub>1</sub> o 15d-PGJ<sub>2</sub> inhiben la inducción, mediada por el combinado TPA+Ion, de la expresión de genes esenciales en la respuesta inmune o inflamatoria como COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-6 tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína. Además de estas acciones inhibitorias, ambas CyPGs muestran también efectos positivos, incrementando la expresión inducida tras la activación celular de un número de genes entre los que se encuentran la citoquina IL-8 o la proteína de choque térmico HSP-70. La acción inductora de las CyPGs sobre la expresión de IL-8 descrita en monocitos se ha atribuido a acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> independientes de PPAR $\gamma$ , actuando sobre la actividad de MAPKs (Fu et al., 2002; Jozkowicz et al., 2001). Por su parte, la inducción de estrés oxidativo por las CyPGs sería esencial en la inducción de proteínas de choque térmico como HSP-70 (Iannaro et al., 2003; Rossi et al., 1996).

Por otro lado, las acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y la PGA<sub>1</sub> discrepan en sus efectos sobre la expresión inducida de IL-13 tras el tratamiento con TPA+Ion, de forma que la PGA<sub>1</sub> incrementa ligeramente la inducción de IL-13, mientras que la dienona inhibe



sustancialmente el incremento en los niveles de ARNm de esta citoquina. Asimismo, se observa un efecto diferencial de la  $PGA_1$  sobre la actividad del promotor de la IL-13 con respecto a la 15d-PGJ<sub>2</sub>. Esto podría deberse a las acciones inductoras observadas para la  $PGA_1$  sobre el factor de transcripción AP-1, que participa en la regulación transcripcional de esta citoquina (Liang et al., 2012).

Las acciones de las CyPGs sobre la expresión génica se atribuyen principalmente a sus efectos sobre la actividad de factores de transcripción como aquellos que participan en la regulación de genes esenciales en la respuesta inmune, tales como AP-1, NF- $\kappa$ B, o NFAT, entre otros (Amici et al., 2004; Cernuda-Morollón et al., 2001; Chung et al., 2003; Pérez-Sala et al., 2003; Straus et al., 2000; Surh et al., 2011).

En cuanto a sus efectos sobre la activación del factor de transcripción AP-1, nuestros resultados indican que, a las dosis usadas, las CyPGs cooperan con la inducción mediada por TPA+Ion de la transcripción dependiente de AP-1, siendo este efecto más notable en el caso de la  $PGA_1$ . Además de los datos sobre la inducción de la construcción AP-1-luc, hemos observado un incremento en los niveles de ARNm de los componentes de AP-1, c-Jun y c-Fos. Estos resultados coinciden con los presentados en el trabajo de Ishikawa y colaboradores, que muestran como el incremento en los niveles de c-Fos en una línea celular epitelial se corresponde con una inducción de la unión de este factor de transcripción al ADN y por tanto de la transcripción mediada por AP-1 (Ishikawa et al., 2000). Por el contrario, otros trabajos han descrito un efecto inhibitorio de la unión al ADN de AP-1, y por tanto de la transcripción dependiente de este factor en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> (Grau et al., 2004; Pérez-Sala et al., 2003). El efecto inductor observado sobre AP-1 de la  $PGA_1$  sería el responsable de la inducción que se produce a dosis bajas de esta CyPG sobre la actividad de promotores de genes como IL-2, IL-6 o IL-13, en cuya transcripción participa AP-1 junto con otros factores de transcripción, como IL-2. El hecho de que a concentraciones mayores se revierta este efecto inductor, se debería a que las acciones inhibitorias de la  $PGA_1$  sobre otros factores de transcripción responsables de la regulación de la expresión de estos genes, como NF- $\kappa$ B o NFAT, prevalecen sobre su efecto inductor sobre AP-1, tal y como se observa en el análisis de la expresión de IL-2 e IL-6 a nivel de ARNm y proteína.

De acuerdo a los diversos trabajos que han descrito la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B a diferentes niveles como la responsable de muchos de los efectos de las CyPGs sobre la expresión génica (Amici et al., 2004; Cernuda-Morollón et al., 2001; Rossi et al., 2000; Straus et al., 2000), nuestros resultados confirman que, en células T, ambas CyPGs interfieren con la activación de NF- $\kappa$ B. De tal manera, hemos comprobado que  $PGA_1$  y 15d-PGJ<sub>2</sub> disminuyen sustancialmente la transcripción dependiente de la construcción NF- $\kappa$ B-luc, afectando también a la fosforilación y degradación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B y por tanto al paso al núcleo de NF- $\kappa$ B, sin descartar acciones directas que interfieran con la unión al ADN de este factor.

Como se discutirá con más detalle en el siguiente apartado, en el ámbito de los efectos de las CyPGs sobre NFAT, los resultados obtenidos indican que, en las acciones

observadas sobre la transcripción génica en linfocitos T, participan principalmente mecanismos independientes de las propiedades de estos compuestos como ligandos del receptor PPAR $\gamma$ . De tal manera, sólo tras la sobreexpresión de este receptor en células Jurkat se pudieron observar efectos inhibitorios significativos a nivel transcripcional por ligandos de PPAR $\gamma$  que no tienen capacidad de modificar proteínas de forma covalente, como el CAY10410.

#### **4. Las CyPGs inhiben la transcripción mediada por NFAT por mecanismos independientes de PPAR $\gamma$**

Un aspecto relevante de este trabajo tiene que ver con las observaciones acerca de cómo las acciones de las CyPGs sobre la regulación de la expresión génica tienen lugar en gran medida a través de su interferencia con la activación del factor de transcripción NFAT de forma independiente de PPAR $\gamma$ . Las acciones de las CyPGs sobre este factor de transcripción han sido poco estudiadas, habiendo sido descritas únicamente en el contexto de las acciones de la 15d-PGJ<sub>2</sub> como ligando de PPAR $\gamma$ . De tal forma, se ha descrito la interacción directa entre este receptor nuclear y NFATc1 en células T (Chung et al., 2003; Yang et al., 2000) y en cardiomiocitos de rata (Bao et al., 2008). Yang y colaboradores, han descrito efectos inhibidores de 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la transcripción dependiente de NFAT tras la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  en células Jurkat (Yang et al., 2000).

La regulación transcripcional mediada por NFAT requiere generalmente de la cooperación con otros factores de transcripción, siendo el tándem que forma con AP-1 regulador de numerosos genes expresados durante la respuesta inmune tales como COX-2 o IL-2 (Macian et al., 2001). Nuestros resultados muestran que la inhibición de la transcripción dependiente de NFAT se produce tanto en el contexto de elementos de respuesta NFAT/AP-1, como en el caso de la construcción NFAT-luc como en el caso de promotores no dependientes de AP-1 como el gen RCAN-1. Otras evidencias de la implicación de NFAT en las acciones de las CyPGs sobre la actividad transcripcional vienen de los resultados obtenidos tras la sobreexpresión de NFAT o de una forma constitutivamente activa de la fosfatasa Calcineurina ( $\Delta$ Cam), que indicarían una relación directa entre los niveles de NFAT y las acciones de las CyPGs.

El proceso de activación de NFAT, que culmina en la inducción transcripcional de genes diana, requiere de diversos pasos esenciales entre los que se incluyen: la activación de la señal de Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina y la inducción de la actividad de la fosfatasa Calcineurina que desfosforila a NFAT para su paso al núcleo, donde se une a secuencias específicas en la región promotora de genes diana (Oh-hora y Rao, 2008; Pan et al., 2013). El análisis del mecanismo de acción de PGA<sub>1</sub> y 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la activación de NFAT, revela su interferencia a distintos niveles dentro de este proceso. Por un lado, la presencia de dosis crecientes de CyPGs produce una disminución de los niveles de NFAT desfosforilado que se traduce en la retención de NFAT en el citosol. Estos resultados indicarían una posible acción de las CyPGs sobre la activación o función de la ruta Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina/Calcineurina. A falta de conocer las posibles acciones de las CyPGs sobre la señal de calcio en linfocitos

T, tan sólo disponemos de los datos sobre la ausencia de efecto de estos compuestos sobre la movilización de calcio en respuesta a SDF-1 $\alpha$ . Raman y colaboradores han descrito la modulación de la transcripción dependiente de NFAT en linfocitos T por el 15d-PGJ<sub>2</sub>-glicerol, un análogo de la 15d-PGJ<sub>2</sub> ligando de PPAR $\gamma$  (Raman et al., 2012). Estos autores describen la inhibición de la movilización de calcio por este análogo vía PPAR $\gamma$ , en células Jurkat tratadas con TPA+Ion. Por otro lado, nuestros resultados *in vitro*, descartan un efecto inhibitorio a través de la interacción directa de las CyPGs sobre una Calcineurina purificada. Esto no descarta la posibilidad de que la actividad de la Calcineurina se vea alterada en ensayos *in vivo*, realizados con extractos de células activadas y tratadas con los diversos compuestos a ensayar.

Por su parte, nuestros resultados no permiten determinar un aumento en la degradación de NFAT tras el tratamiento con CyPGs, como se ha descrito en el caso del 15d-PGJ<sub>2</sub>-glicerol a través del incremento en los niveles de HDM2 activa, una ubiquitin ligasa que media la degradación dependiente de PPAR $\gamma$  de NFAT (Raman et al., 2012).

En este trabajo se muestra que, tras el tratamiento de las células en cultivo con CyPGs, se produce una disminución de la formación de complejos NFAT-ADN, lo que podría explicarse por el hecho de que estos compuestos inhiben el paso de NFAT al núcleo. Sin embargo, de manera adicional, la incubación *in vitro* de extractos nucleares con diferentes concentraciones de 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> también promovió la inhibición de la unión de NFAT al ADN, sugiriendo la existencia de una interferencia directa de las CyPGs con este factor de transcripción en su unión a los elementos de respuesta en el ADN. La interacción directa de CyPGs con factores de transcripción y su influencia en la unión al ADN ha sido descrita para los factores AP-1 y NF- $\kappa$ B, en los que se ha identificado la unión covalente de CyPGs a residuos de cys (Cernuda-Morollón et al., 2001; Pérez-Sala et al., 2003; Straus et al., 2000), no existiendo referencias previas al respecto en el caso de NFAT.

Mediante diferentes ensayos *in vivo* e *in vitro*, utilizando análogos biotinilados de la PGA<sub>1</sub> y 15d-PGJ<sub>2</sub> que mantienen los efectos biológicos independientes de PPAR $\gamma$  de las CyPGs en cuestión (Garzón et al., 2010), hemos podido poner de manifiesto la existencia de una interacción directa entre NFATc2 y estas CyPGs. Dicha modificación es dependiente de la concentración de CyPG, observándose que la 15d-PGJ<sub>2</sub> tiene mayor capacidad para modificar proteínas covalentemente y que, por tanto, se requieren menores concentraciones que de PGA<sub>1</sub> para mediar estos efectos, tal y como ha sido descrito por otros grupos (Gayarre et al., 2005; Rossi et al., 2000; Straus et al., 2000). La naturaleza electrofílica de las CyPGs es la responsable de su capacidad para unirse de forma covalente a proteínas formando aductos de forma mayoritaria con residuos de cisteína (Garzon et al., 2011; Straus y Glass, 2001), si bien en algún caso se ha descrito la unión de CyPGs a residuos de histidina (Yamaguchi et al., 2010). Los resultados obtenidos tras la competición de la unión con el tratamiento con Iodoacetamida, apunta a una modificación de residuos de cys en el NFAT por parte de la PGA<sub>1</sub> y la 15d-PGJ<sub>2</sub>. La unión de análogos biotinilados de estas CyPGs a NFAT es competida por ambas CyPGs no biotiniladas, sugiriendo que ambas se estarían uniendo a residuo/s común/es en NFAT. Sin embargo, el hecho de que



una concentración 200 veces superior de la  $\text{PGA}_1$  no compita completamente la unión de la dienona  $15\text{-d-PGJ}_2$ , sugeriría que la  $15\text{-d-PGJ}_2$  se esté uniendo a más de una cys, y que no todas sean modificadas por la  $\text{PGA}_1$ . El hecho de que las CyPGs puedan modificar diferentes cys dentro de una misma molécula ya se ha descrito en el caso de las proteínas Ras (Renedo et al., 2007). Por otro lado, el hecho de que la presencia de dosis crecientes de CyPG-B compita con la unión del anticuerpo anti-NFATc2 (672) pero no con el anticuerpo anti-NFATc2 (sc), dirigido frente a un epítipo diferente (generado frente a los aminoácidos 433-567 de NFATc2 de ratón), sugiere un impedimento estérico de forma que la región de unión del anticuerpo NFATc2 (672)  $\text{NH}_2\text{-}^{53}\text{SPPSGPAYPDDVLDYGLK}^{70}$  se encontraría próxima a la/s cys modificada/s por las CyPGs.

El uso de técnicas proteómicas ha permitido la identificación de los residuos modificados covalentemente por CyPGs en diversas proteínas (Garzon et al., 2011). Las primeras aproximaciones llevadas a cabo en el laboratorio para la identificación de los residuos modificados en el caso de la proteína NFATc2 no nos han permitido obtener resultados concluyentes a este respecto. En una primera aproximación en la que se analizaron por MALDI-TOF y LC-MS/MS muestras de NFATc2 recombinante incubado con  $\text{PGA}_1$  y digerido con Tripsina y quimiotripsina, no fue posible detectar modificación alguna compatible con la unión de  $\text{PGA}_1$  a NFAT, dada la mala cobertura de péptidos obtenidos. Tan sólo fue posible descartar la unión de  $\text{PGA}_1$  a 4 de las 16 cys presentes en la proteína. Estudios proteómicos avanzados con el uso de nuevas estrategias para mejorar la cobertura de la secuencia a analizar permitirán definir con detalle las posibles modificaciones promovidas por las CyPGs sobre NFAT.

## 5. Relevancia fisiopatológica de las acciones de las CyPGs

La dificultad para determinar de manera precisa los niveles de CyPGs como la  $15\text{-d-PGJ}_2$  *in vivo*, la falta de evidencias de una actividad enzimática responsable de su formación, así como el hecho de que se encuentren en su mayor parte formando aductos con proteínas celulares, ha abierto un debate sobre la relevancia biológica de los niveles endógenos de estas CyPGs en fluidos biológicos (Garzon et al., 2011; Oh et al., 2008; Powell, 2003). Diversos trabajos han descrito un incremento de los niveles de  $15\text{-d-PGJ}_2$  durante la fase de resolución de la inflamación en modelos animales (Gilroy et al., 1999; Haworth y Buckley, 2007). Por otro lado, se ha determinado la presencia de concentraciones en el rango picomolar a nanomolar en tejidos humanos (Diez-Dacal y Perez-Sala, 2010), suficientes para llevar a cabo algunos de sus efectos biológicos conocidos, aunque por debajo de los ensayados para algunas de las acciones farmacológicas de estos agentes en modelos experimentales. Son pocos los estudios dedicados a conocer la presencia endógena de CyPGs de la serie A, habiéndose detectado en el plasma de individuos sanos niveles en el rango picomolar a nanomolar. Éstos se ven reducidos en muestras procedentes de pacientes con artritis reumatoide tratados con indometacina, un inhibidor de la síntesis de prostanoïdes (Zia et al., 1975; Zusman et al., 1972). Las mejoras y el aumento de sensibilidad de las técnicas para el estudio de los perfiles lipídicos mediante lipidómica permitirán determinar con mayor precisión la relevancia de los niveles endógenos

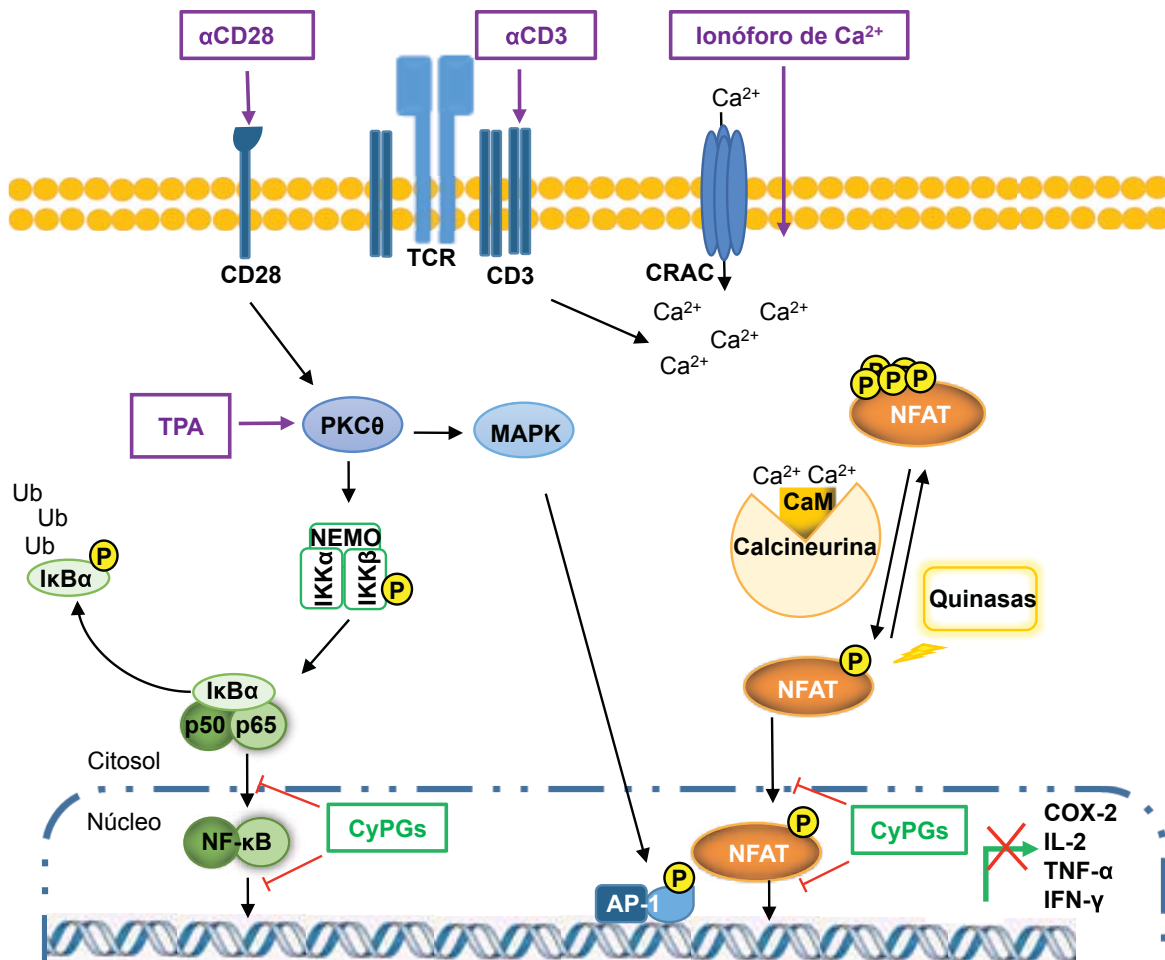
de estas CyPGs y de sus alteraciones en situaciones fisiopatológicas. En cualquier caso, los estudios llevados a cabo hasta la fecha, ponen de manifiesto que los efectos finales de estas CyPGs dependen no sólo de las concentraciones presentes en la célula, sino de múltiples factores como el tiempo de exposición, el tipo celular o la presencia de proteínas efectoras y secuestradoras.

Nuestros estudios aportan nuevos datos sobre las acciones de las CyPGs que apoyarían la potencial utilidad terapéutica de las CyPGs en el tratamiento de enfermedades con una respuesta inmune o inflamatoria exacerbada. Son varias las evidencias del potencial terapéutico de este tipo de compuestos como los que definen su papel en el proceso de la resolución de la inflamación (Gilroy et al., 2004; Itoh et al., 2004; Rajakariar et al., 2007; Surh et al., 2011).

De tal manera, el tratamiento con 15d-PGJ<sub>2</sub>, es capaz de aliviar diversos procesos patológicos relacionados con proceso inflamatorios *in vivo* (Cuzzocrea et al., 2003; Cuzzocrea et al., 2002; Chatterjee et al., 2004; Kawahito et al., 2000), siendo capaz de aliviar el avance de una enfermedad asociada con una función anómala de los linfocitos T como es la esclerosis múltiple en un modelo experimental en ratón de encefalitis autoimune (Diab et al., 2002). De especial interés son los estudios de los efectos anti-inflamatorios *in vivo* de la 15d-PGJ<sub>2</sub> llevados a cabo con la administración de formulaciones en nanocápsulas o liposomas (Clemente-Napimoga et al., 2012; Homem de Bittencourt et al., 2007). Ahora bien, a pesar de su demostrado potencial farmacológico, dada la variedad de efectos pleiotrópicos descritos *in vitro* para estas CyPGs, la dependencia del contexto, de la dosis usada y de la propia naturaleza molecular de las mismas, son necesarios estudios sistemáticos que permitan determinar con mayor precisión su utilidad terapéutica *in vivo*.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral aportan nuevas evidencias acerca de las acciones inmunomoduladoras y anti-inflamatorias de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y la PGA<sub>1</sub> en linfocitos T, interfiriendo en el proceso de activación de éstos a diferentes niveles: proliferación y supervivencia celular, migración y regulación de la expresión génica. De tal manera, estas CyPGs muestran acciones pleiotrópicas en la fisiología de los linfocitos T y, si bien ambas CyPGs comparten muchos de los efectos observados, existen singularidades propias de cada una de ellas.

En particular, este trabajo proporciona nuevos datos acerca de las acciones de las CyPGs en la regulación de la expresión génica, a través de su interferencia con la activación del factor de transcripción NFAT. De tal manera, las acciones inhibitoras de la 15d-PGJ<sub>2</sub> y la PGA<sub>1</sub> sobre la expresión de genes activados durante la respuesta inmune en células T serían debidas a la inhibición de la actividad transcripcional mediada tanto por NF-κB como NFAT, interfiriendo con su activación de forma independiente a PPARγ (Figura D2).



**Figura D2: Modelo de las acciones inhibitorias de las CyPGs sobre la expresión génica en células T activadas.** Tras la activación de las células T con el combinado farmacológico TPA+Ion o los anticuerpos agonistas  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28, se activan las rutas de señalización responsables de la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 y NFAT. La activación de éstos es necesaria para la transcripción de genes que se inducen en la respuesta inflamatoria, tales como COX-2, IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , entre otros. Las CyPGs, 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub>, interfieren con la degradación de la proteína I $\kappa$ B y por tanto con el paso al núcleo de NF- $\kappa$ B, reduciendo su unión al ADN. Las CyPGs también interfieren con el paso al núcleo de NFAT y se unen a este factor de transcripción de forma directa, inhibiendo así su unión al ADN.

## CONCLUSIONES

---



1. Las prostaglandinas ciclopentenonas (CyPGs) 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> poseen efectos inhibidores sobre la activación del linfocito T.
2. Estas CyPGs disminuyen la proliferación de las células T que se produce tras la activación celular.
3. La inducción de muerte celular en la línea celular humana transformada tipo T Jurkat en respuesta al tratamiento con 15d-PGJ<sub>2</sub> es significativamente mayor que la producida por la PGA<sub>1</sub>. Este efecto de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la viabilidad celular, es sustancialmente menor en células primarias (PBLs o LTs) humanas.
4. Las diferencias observadas entre los efectos de ambas CyPGs respecto a la muerte celular, no se deben a discrepancias en cuanto a la producción de ROS.
5. Las CyPGs 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> inhiben la migración de linfocitos T inducida por SDF-1 $\alpha$  de manera dependiente de la concentración. Uno de los posibles mecanismos de estas acciones tiene que ver la inhibición de la actividad PI3K y con la inhibición de la polimerización de los filamentos de Actina.
6. El tratamiento con 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> produce alteraciones en los patrones de expresión de genes esenciales en la activación y función de los Linfocitos T. Estos efectos no son del todo equivalentes para ambas CyPGs, mostrando efectos diferenciales sobre la expresión de ciertos genes.
7. Ambas CyPGs inhiben la inducción de la expresión de genes con un papel relevante en la respuesta inmune y en la inflamación, tales como IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y COX-2, que se produce tras la activación de los linfocitos T.
8. Los efectos inhibitorios sobre la inducción de la expresión de estos genes tiene lugar principalmente mediante acciones independientes de la unión de estas CyPGs a PPAR $\gamma$ , y a través de la interferencia con la activación de factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B y NFAT.
9. La inhibición de la activación transcripcional mediada por NFAT llevada a cabo por las CyPGs, tiene lugar mediante la interferencia a diferentes niveles, como el paso al núcleo del factor de transcripción y su unión al ADN.
10. El estudio del mecanismo de interacción de 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> con la activación de NFAT apunta a la modificación covalente de este factor de transcripción por ambas CyPGs.



## BIBLIOGRAFÍA

---





- Akahoshi, T., Namai, R., Murakami, Y., Watanabe, M., Matsui, T., Nishimura, A., Kitasato, H., Kameya, T., y Kondo, H. (2003). Rapid induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human monocytes by monosodium urate monohydrate crystals. *Arthritis Rheum* 48, 231-239.
- Aldini, G., Carini, M., Vistoli, G., Shibata, T., Kusano, Y., Gamberoni, L., Dalle-Donne, I., Milzani, A., y Uchida, K. (2007). Identification of actin as a 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 target in neuroblastoma cells: mass spectrometric, computational, and functional approaches to investigate the effect on cytoskeletal derangement. *Biochemistry* 46, 2707-2718.
- Alvarez-Maqueda, M., El Bekay, R., Alba, G., Monteseirin, J., Chacon, P., Vega, A., Martin-Nieto, J., Bedoya, F.J., Pintado, E., y Sobrino, F. (2004). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes. *J Biol Chem* 279, 21929-21937.
- Amici, C., Belardo, G., Rozera, C., Bernasconi, D., y Santoro, M.G. (2004). Inhibition of herpesvirus-induced HIV-1 replication by cyclopentenone prostaglandins: role of IκB kinase (IKK). *AIDS* 18, 1271-1280.
- Amici, C., Rossi, A., Costanzo, A., Ciafrè, S., Marinari, B., Balsamo, M., Levrero, M., y Santoro, M.G. (2006). Herpes Simplex Virus Disrupts NF-κB Regulation by Blocking Its Recruitment on the IκBα Promoter and Directing the Factor on Viral Genes. *Journal of Biological Chemistry* 281, 7110-7117.
- Amici, C., y Santoro, M.G. (1991). Suppression Of Virus Replication By Prostaglandin A Is Associated With Heat Shock Protein Synthesis. *Journal of General Virology* 72, 1877-1885.
- Anwar, A., John Anwar, I., y Delafontaine, P. Elevation of cardiovascular risk by non-steroidal anti-inflammatory drugs (Trends Cardiovasc Med. 2015 Mar 12. pii: S1050-1738(15)00079-1. doi: 10.1016/j.tcm.2015.03.006.).
- Arenzana-Seisdedos, F., Fernandez, B., Dominguez, I., Jacqué, J.M., Thomas, D., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., y Virelizier, J.L. (1993). Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes. *Journal of Virology* 67, 6596-6604.
- Azuma, Y., Shinohara, M., Wang, P.-L., y Ohura, K. (2001). 15-Deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2 Inhibits IL-10 and IL-12 Production by Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283, 344-346.
- Baaten, B.J., Cooper, A.M., Swain, S.L., y Bradley, L.M. (2013). Location, location, location: the impact of migratory heterogeneity on T cell function. *Front Immunol* 4, 00311.
- Bao, Y., Li, R., Jiang, J., Cai, B., Gao, J., Le, K., Zhang, F., Chen, S., y Liu, P. (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits endothelin-1-induced cardiac hypertrophy via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 317, 189-196.
- Baron, J.A., Sandler, R.S., Bresalier, R.S., Lanus, A., Morton, D.G., Riddell, R., Iverson, E.R., y DeMets, D.L. (2008). Cardiovascular events associated with rofecoxib: final analysis of the APPROVe trial. *The Lancet* 372, 1756-1764.
- Basu, S. (2007). Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F2alpha from physiology to new principles in inflammation. *Med Res Rev* 27, 435-468.

Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J.C., Staels, B., y Glineur, C. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85, 267-273.

Boyman, O., y Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12, 180-190.

Brechbuhl, H.M., Min, E., Kariya, C., Frederick, B., Raben, D., y Day, B.J. (2009). Select cyclopentenone prostaglandins trigger glutathione efflux and the role of ABCG2 transport. *Free Radic Biol Med* 47, 722-730.

Brownlie, R.J., y Zamoyska, R. (2013). T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 13, 257-269.

Cano, E., Canellada, A., Minami, T., Iglesias, T., y Redondo, J.M. (2005). Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway. *J Biol Chem* 280, 29435-29443.

Castrillo, A., Traves, P.G., Martin-Sanz, P., Parkinson, S., Parker, P.J., y Bosca, L. (2003). Potentiation of protein kinase C zeta activity by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) induces an imbalance between mitogen-activated protein kinases and NF-kappa B that promotes apoptosis in macrophages. *Mol Cell Biol* 23, 1196-1208.

Cernuda-Morollón, E., Pineda-Molina, E., Cañada, F.J., y Pérez-Sala, D. (2001). 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> Inhibition of NF- $\kappa$ B-DNA Binding through Covalent Modification of the p50 Subunit. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35530-35536.

Cippitelli, M., Fionda, C., Di Bona, D., Lupo, A., Piccoli, M., Frati, L., y Santoni, A. (2003). The Cyclopentenone-Type Prostaglandin 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J<sub>2</sub> Inhibits CD95 Ligand Gene Expression in T Lymphocytes: Interference with Promoter Activation Via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ -Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology* 170, 4578-4592.

Clark, R.B., Bishop-Bailey, D., Estrada-Hernandez, T., Hla, T., Puddington, L., y Padula, S.J. (2000). The Nuclear Receptor PPAR $\gamma$  and Immunoregulation: PPAR $\gamma$  Mediates Inhibition of Helper T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 164, 1364-1371.

Clemente-Napimoga, J.T., Moreira, J.A., Grillo, R., de Melo, N.F., Fraceto, L.F., y Napimoga, M.H. (2012). 15d-PGJ<sub>2</sub>-loaded in nanocapsules enhance the antinociceptive properties into rat temporomandibular hypernociception. *Life Sci* 90, 944-949.

Cocca, C., Dorado, J., Calvo, E., Lopez, J.A., Santos, A., y Perez-Castillo, A. (2009). 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J<sub>2</sub> is a tubulin-binding agent that destabilizes microtubules and induces mitotic arrest. *Biochem Pharmacol* 78, 1330-1339.

Cunard, R., Eto, Y., Muljadi, J.T., Glass, C.K., Kelly, C.J., y Ricote, M. (2004). Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* 172, 7530-7536.

Cuzick, J., Otto, F., Baron, J.A., Brown, P.H., Burn, J., Greenwald, P., Jankowski, J., La Vecchia, C., Meyskens, F., Senn, H.J., *et al.* (2009). Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *The Lancet Oncology* 10, 501-507.

- Cuzzocrea, S., Ianaro, A., Wayman, N.S., Mazzon, E., Pisano, B., Dugo, L., Serraino, I., Di Paola, R., Chatterjee, P.K., Di Rosa, M., *et al.* (2003). The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- $\Delta(12,14)$ -PGJ(2) attenuates the development of colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat. *British Journal of Pharmacology* 138, 678-688.
- Cuzzocrea, S., Wayman, N.S., Mazzon, E., Dugo, L., Di Paola, R., Serraino, I., Britti, D., Chatterjee, P.K., Caputi, A.P., y Thiernemann, C. (2002). The Cyclopentenone Prostaglandin 15-Deoxy- $\Delta 12,14$ -Prostaglandin J2 Attenuates the Development of Acute and Chronic Inflammation. *Molecular Pharmacology* 61, 997-1007.
- Chang, S.H., Liu, C.H., Conway, R., Han, D.K., Nithipatikom, K., Trifan, O.C., Lane, T.F., y Hla, T. (2004). Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 591-596.
- Chatterjee, P.K., Patel, N.S., Cuzzocrea, S., Brown, P.A., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., Britti, D., Eberhardt, W., Pfeilschifter, J., y Thiernemann, C. (2004). The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure. *Cardiovasc Res* 61, 630-643.
- Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P., y Evans, R.M. (2001). PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 7, 48-52.
- Chearwae, W., y Bright, J.J. (2008). 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and curcumin modulate the expression of toll-like receptors 4 and 9 in autoimmune T lymphocyte. *J Clin Immunol* 28, 558-570.
- Chen, K., Li, J., Wang, J., Xia, Y., Dai, W., Wang, F., Shen, M., Cheng, P., Zhang, Y., Wang, C., *et al.* (2014). 15-Deoxy- gamma 12,14-prostaglandin J2 Reduces Liver Impairment in a Model of ConA-Induced Acute Hepatic Inflammation by Activation of PPAR gamma and Reduction in NF- kappa B Activity. *PPAR Res* 215631, 10.
- Chen, Y.-C., Shen, S.-C., y Tsai, S.-H. (2005). Prostaglandin D2 and J2 induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1743, 291-304.
- Cho, W.H., Choi, C.H., Park, J.Y., Kang, S.K., y Kim, Y.K. (2006). 15-deoxy-(Delta12,14)-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) induces cell death through caspase-independent mechanism in A172 human glioma cells. *Neurochem Res* 31, 1247-1254.
- Chun, K.S., y Surh, Y.J. (2004). Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 68, 1089-1100.
- Chung, S.W., Kang, B.Y., Kim, S.H., Pak, Y.K., Cho, D., Trinchieri, G., y Kim, T.S. (2000). Oxidized Low Density Lipoprotein Inhibits Interleukin-12 Production in Lipopolysaccharide-activated Mouse Macrophages via Direct Interactions between Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  and Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry* 275, 32681-32687.
- Chung, S.W., Kang, B.Y., y Kim, T.S. (2003). Inhibition of Interleukin-4 Production in CD4+ T Cells by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) Ligands: Involvement of Physical Association between PPAR- $\gamma$  and the Nuclear Factor of Activated T Cells Transcription Factor. *Molecular Pharmacology* 64, 1169-1179.
- Dar, A.A., Patil, R.S., y Chiplunkar, S.V. (2014). Insights into the Relationship between Toll Like Receptors and Gamma Delta T Cell Responses. *Front Immunol* 5.

Das, U.N. (2006). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J* 1, 420-439.

de Gregorio, R., Iñiguez, M.A., Fresno, M., y Alemany, S. (2001). Cot Kinase Induces Cyclooxygenase-2 Expression in T Cells through Activation of the Nuclear Factor of Activated T Cells. *Journal of Biological Chemistry* 276, 27003-27009.

de Lourdes Perim, A., Amarante, M.K., Guembarovski, R.L., de Oliveira, C.E., y Watanabe, M.A. (2015). CXCL12/CXCR4 axis in the pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia (ALL): a possible therapeutic target. *Cell Mol Life Sci* 72, 1715-1723.

Devreotes, P., y Horwitz, A.R. (2015). Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.

Diab, A., Deng, C., Smith, J.D., Hussain, R.Z., Phanavanh, B., Lovett-Racke, A.E., Drew, P.D., y Racke, M.K. (2002). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Agonist 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14 $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 168, 2508-2515.

Diers, A.R., Dranka, B.P., Ricart, K.C., Oh, J.Y., Johnson, M.S., Zhou, F., Pallero, M.A., Bodenshtein, T.M., Murphy-Ullrich, J.E., Welch, D.R., *et al.* (2010). Modulation of mammary cancer cell migration by 15-deoxy- $\Delta$ (12,14)-prostaglandin J(2): implications for anti-metastatic therapy. *Biochem J* 430, 69-78.

Diez-Dacal, B., y Perez-Sala, D. (2010). Anti-inflammatory prostanoids: focus on the interactions between electrophile signaling and resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal* 10, 655-675.

Diez-Dacal, B., y Perez-Sala, D. (2012). A-class prostaglandins: early findings and new perspectives for overcoming tumor chemoresistance. *Cancer Lett* 320, 150-157.

Dolganov, G., Bort, S., Lovett, M., Burr, J., Schubert, L., Short, D., McGurn, M., Gibson, C., y Lewis, D.B. (1996). Coexpression of the interleukin-13 and interleukin-4 genes correlates with their physical linkage in the cytokine gene cluster on human chromosome 5q23-31. *Blood* 87, 3316-3326.

Doring, Y., Pawig, L., Weber, C., y Noels, H. (2014). The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol* 5.

Durand, D.B., Shaw, J.P., Bush, M.R., Replogle, R.E., Belagaje, R., y Crabtree, G.R. (1988). Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol Cell Biol* 8, 1715-1724.

Eickelberg, O., Roth, M., Mussmann, R., Rudiger, J.J., Tamm, M., Perruchoud, A.P., y Block, L.H. (1999). Calcium channel blockers activate the interleukin-6 gene via the transcription factors NF-IL6 and NF-kappaB in primary human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 99, 2276-2282.

Fan, C., Katsuyama, M., Wei, H., Xia, Q., Liu, W., y Yabe-Nishimura, C. (2010). Molecular mechanisms underlying PGF2 $\alpha$ -induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *Yakugaku Zasshi* 130, 211-214.

Farnesi-de-Assuncao, T.S., Alves, C.F., Carregaro, V., de Oliveira, J.R., da Silva, C.A., Cheraim, A.B., Cunha, F.Q., y Napimoga, M.H. (2012). PPAR-gamma agonists, mainly 15d-PGJ(2), reduce eosinophil recruitment following allergen challenge. *Cell Immunol* 273, 23-29.

- Fionda, C., Nappi, F., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A., y Cippitelli, M. (2007). Inhibition of Trail Gene Expression by Cyclopentenonic Prostaglandin 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 in T Lymphocytes. *Molecular Pharmacology* 72, 1246-1257.
- Fitzpatrick, F.A., y Wynalda, M.A. (1983). Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem* 258, 11713-11718.
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., y Evans, R.M. (1995). 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . *Cell* 83, 803-812.
- Fu, H., Wang, A., Mauro, C., y Marelli-Berg, F. (2013). T lymphocyte trafficking: molecules and mechanisms. *Front Biosci* 18, 422-440.
- Fu, Y., Luo, N., y Lopes-Virella, M.F. (2002). Upregulation of interleukin-8 expression by prostaglandin D2 metabolite 15-deoxy-delta12, 14 prostaglandin J2 (15d-PGJ2) in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 160, 11-20.
- Fukushima, M., Kato, T., Ota, K., Arai, Y., Narumiya, S., y Hayaishi, O. (1982). 9-Deoxy- $\Delta$ 9-prostaglandin D2, a prostaglandin D2 derivative with potent antineoplastic and weak smooth muscle-contracting activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 109, 626-633.
- Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., y Groopman, J.E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273, 23169-23175.
- Garzón, B., Gayarre, J., Gharbi, S., Díez-Dacal, B., Sánchez-Gómez, F.J., Timms, J.F., y Pérez-Sala, D. (2010). A biotinylated analog of the anti-proliferative prostaglandin A1 allows assessment of PPAR-independent effects and identification of novel cellular targets for covalent modification. *Chemico-Biological Interactions* 183, 212-221.
- Garzon, B., Oeste, C.L., Diez-Dacal, B., y Perez-Sala, D. (2011). Proteomic studies on protein modification by cyclopentenone prostaglandins: expanding our view on electrophile actions. *J Proteomics* 74, 2243-2263.
- Gasparini, C., Celeghini, C., Monasta, L., y Zauli, G. (2014). NF-kappaB pathways in hematological malignancies. *Cell Mol Life Sci* 71, 2083-2102.
- Gayarre, J., Sanchez, D., Sanchez-Gomez, F.J., Terron, M.C., Llorca, O., y Perez-Sala, D. (2006). Addition of electrophilic lipids to actin alters filament structure. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 1387-1393.
- Gayarre, J., Stamatakis, K., Renedo, M., y Perez-Sala, D. (2005). Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins PGA1 and 15-deoxy-Delta12,14-PGJ2: role of glutathione. *FEBS Lett* 579, 5803-5808.
- Gharbi, S., Garzon, B., Gayarre, J., Timms, J., y Perez-Sala, D. (2007). Study of protein targets for covalent modification by the antitumoral and anti-inflammatory prostaglandin PGA1: focus on vimentin. *J Mass Spectrom* 42, 1474-1484.
- Ghosh, A.K., Bhattacharyya, S., Wei, J., Kim, S., Barak, Y., Mori, Y., y Varga, J. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *Faseb J* 23, 2968-2977.



- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., y Willoughby, D.A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 5, 698-701.
- Gilroy, D.W., Lawrence, T., Perretti, M., y Rossi, A.G. (2004). Inflammatory Resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 3, 401-416.
- Giri, S., Rattan, R., Singh, A.K., y Singh, I. (2004). The 15-Deoxy- $\delta$ 12,14-Prostaglandin J2 Inhibits the Inflammatory Response in Primary Rat Astrocytes via Down-Regulating Multiple Steps in Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt-NF- $\kappa$ B-p300 Pathway Independent of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ . *The Journal of Immunology* 173, 5196-5208.
- Glass, C.K., y Saijo, K. (2010). Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol* 10, 365-376.
- Goetze, S., Xi, X.P., Kawano, H., Gotlibowski, T., Fleck, E., Hsueh, W.A., y Law, R.E. (1999). PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 33, 798-806.
- Gómez-Casero, E., San-Antonio, B., Iñiguez, M.A., y Fresno, M. (2007). Cot/Tpl2 and PKC $\zeta$  cooperate in the regulation of the transcriptional activity of NFATc2 through the phosphorylation of its amino-terminal domain. *Cellular Signalling* 19, 1652-1661.
- Gomez del Arco, P., Martinez-Martinez, S., Maldonado, J.L., Ortega-Perez, I., y Redondo, J.M. (2000). A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem* 275, 13872-13878.
- Gorospe, M., Liu, Y., Xu, Q., Chrest, F.J., y Holbrook, N.J. (1996). Inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity during growth arrest of human breast carcinoma cells by prostaglandin A2. *Mol Cell Biol* 16, 762-770.
- Grau, R., Iñiguez, M.A., y Fresno, M. (2004). Inhibition of Activator Protein 1 Activation, Vascular Endothelial Growth Factor, and Cyclooxygenase-2 Expression by 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 in Colon Carcinoma Cells: Evidence for a Redox-Sensitive Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ -Independent Mechanism. *Cancer Research* 64, 5162-5171.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L., y Luster, A.D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32, 659-702.
- Grygiel-Górniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutrition Journal* 13, 17-17.
- Gwack, Y., Feske, S., Srikanth, S., Hogan, P.G., y Rao, A. (2007). Signalling to transcription: Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42, 145-156.
- Han, H., Shin, S.-W., Seo, C.-Y., Kwon, H.-C., Han, J.-Y., Kim, I.-H., Kwak, J.-Y., y Park, J.-I. (2007). 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) sensitizes human leukemic HL-60 cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through Akt downregulation. *Apoptosis* 12, 2101-2114.
- Han, S., Sidell, N., Fisher, P.B., y Roman, J. (2004). Up-regulation of p21 gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human lung carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10, 1911-1919.
- Han, Z., Zhu, T., Liu, X., Li, C., Yue, S., Yang, L., y Li, L. (2012). 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 reduces recruitment of bone marrow-derived monocyte/macrophages in chronic liver injury in mice. *Hepatology* 56, 350-360.

- Hanna, S., y El-Sibai, M. (2013). Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular Signalling* 25, 1955-1961.
- Harris, S.G., y Phipps, R.P. (2001). The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol* 31, 1098-1105.
- Harris, S.G., y Phipps, R.P. (2002). Prostaglandin D(2), its metabolite 15-d-PGJ(2), and peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists induce apoptosis in transformed, but not normal, human T lineage cells. *Immunology* 105, 23-34.
- Harris, S.G., Smith, R.S., y Phipps, R.P. (2002). 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 Induces IL-8 Production in Human T Cells by a Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *The Journal of Immunology* 168, 1372-1379.
- Hashimoto, K., Ethridge, R.T., Saito, H., Rajaraman, S., y Evers, B.M. (2003). The PPARgamma ligand, 15d-PGJ2, attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 27, 58-66.
- Haworth, O., y Buckley, C.D. (2007). Resolving the problem of persistence in the switch from acute to chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20647-20648.
- Hayes, M.M., Lane, B.R., King, S.R., Markovitz, D.M., y Coffey, M.J. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit HIV-1 replication in macrophages by transcriptional and post-transcriptional effects. *J Biol Chem* 277, 16913-16919.
- Herlong, J.L., y Scott, T.R. (2006). Positioning prostanoids of the D and J series in the immunopathogenic scheme. *Immunology Letters* 102, 121-131.
- Hilliard, M., Frohnert, C., Spillner, C., Marcone, S., Nath, A., Lampe, T., Fitzgerald, D.J., y Kehlenbach, R.H. (2010). The Anti-inflammatory Prostaglandin 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 Inhibits CRM1-dependent Nuclear Protein Export. *Journal of Biological Chemistry* 285, 22202-22210.
- Hirayama, E., Hattori, M., y Kim, J. (2006). Specific binding of heat shock protein 70 with HN-protein inhibits the HN-protein assembly in Sendai virus-infected Vero cells. *Virus Research* 120, 199-207.
- Hoesel, B., y Schmid, J.A. (2013). The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 12, 1476-4598.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., y Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-2232.
- Homem de Bittencourt, P.I., Jr., Lagranha, D.J., Maslinkiewicz, A., Senna, S.M., Tavares, A.M., Baldissera, L.P., Janner, D.R., Peralta, J.S., Bock, P.M., Gutierrez, L.L., *et al.* (2007). LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 193, 245-258.
- Honn, K.V., y Marnett, L.J. (1985). Requirement of a reactive alpha, beta-unsaturated carbonyl for inhibition of tumor growth and induction of differentiation by "A" series prostaglandins. *Biochem Biophys Res Commun* 129, 34-40.
- Hortelano, S., Castrillo, A., Alvarez, A.M., y Bosca, L. (2000). Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages. *J Immunol* 165, 6525-6531.



- Huang, J., Meyer, C., y Zhu, C. (2012). T cell antigen recognition at the cell membrane. *Mol Immunol* 52, 155-164.
- Hubich, A.I., y Sholukh, M.V. (2006). Biochemistry of prostaglandins A. *Biochemistry* 71, 229-238.
- Ianaro, A., Ialenti, A., Maffia, P., Di Meglio, P., Di Rosa, M., y Santoro, M.G. (2003). Anti-Inflammatory Activity of 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-PGJ2 and 2-Cyclopenten-1-one: Role of the Heat Shock Response. *Molecular Pharmacology* 64, 85-93.
- Iniguez, M.A., Martinez-Martinez, S., Punzon, C., Redondo, J.M., y Fresno, M. (2000). An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275, 23627-23635.
- Ishikawa, T., Sekine, N., Hata, K., Igarashi, T., y Fujita, T. (2000). Prostaglandin A1 enhances c-fos expression and activating protein-1 activity. *Mol Cell Endocrinol* 164, 77-85.
- Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K., y Yamamoto, M. (2004). Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Mol Cell Biol* 24, 36-45.
- Itoh, T., Fairall, L., Amin, K., Inaba, Y., Szanto, A., Balint, B.L., Nagy, L., Yamamoto, K., y Schwabe, J.W.R. (2008). Structural basis for the activation of PPAR[gamma] by oxidized fatty acids. *Nat Struct Mol Biol* 15, 924-931.
- Jozkowicz, A., Dulak, J., Prager, M., Nanobashvili, J., Nigisch, A., Winter, B., Weigel, G., y Huk, I. (2001). Prostaglandin-J2 induces synthesis of interleukin-8 by endothelial cells in a PPAR-gamma-independent manner. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 66, 165-177.
- Jung, W.K., Park, I.S., Park, S.J., Yea, S.S., Choi, Y.H., Oh, S., Park, S.G., y Choi, I.W. (2009). The 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits LPS-stimulated AKT and NF-kappaB activation and suppresses interleukin-6 in osteoblast-like cells MC3T3E-1. *Life Sci* 85, 46-53.
- Kamagata, C., Tsuji, N., Moriai, M., Kobayashi, D., y Watanabe, N. (2007). 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 inhibits G2-M phase progression in human breast cancer cells via the down-regulation of cyclin B1 and survivin expression. *Breast Cancer Research and Treatment* 102, 263-273.
- Kanunfre, C.C., da Silva Freitas, J.J., Pompéia, C., Gonçalves de Almeida, D.C., Cury-Boaventura, M.F., Verlengia, R., y Curi, R. (2004). Ciglitizone and 15d PGJ2 induce apoptosis in Jurkat and Raji cells. *International Immunopharmacology* 4, 1171-1185.
- Karin, M. (1995). The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-activated Protein Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 270, 16483-16486.
- Karin, M., y Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.
- Karin, M., Liu, Z.-g., y Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 240-246.
- Kawahito, Y., Kondo, M., Tsubouchi, Y., Hashiramoto, A., Bishop-Bailey, D., Inoue, K., Kohno, M., Yamada, R., Hla, T., y Sano, H. (2000). 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 106, 189-197.

- Kim, H.J., Rho, Y.H., Choi, S.J., Lee, Y.H., Cheon, H.J., Um, J.W., Sohn, J., Song, G.G., y Ji, J.D. (2005). 15-Deoxy-[Delta]12,14-PGJ2 inhibits IL-6-induced Stat3 phosphorylation in lymphocytes. *Exp Mol Med* 37, 179-185.
- Kim, T.H., Kim, M.Y., Jo, S.H., Park, J.M., y Ahn, Y.H. (2013). Modulation of the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by protein-protein interactions and post-translational modifications. *Yonsei Med J* 54, 545-559.
- Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., y Lehmann, J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813-819.
- Kogan, I., Ramjeesingh, M., Li, C., Kidd, J.F., Wang, Y., Leslie, E.M., Cole, S.P., y Bear, C.E. (2003). CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *Embo J* 22, 1981-1989.
- Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T., y Uchida, K. (2001). Cyclopentenone Prostaglandins as Potential Inducers of Intracellular Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12076-12083.
- Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., y Chlubek, D. (2014). Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochim Pol* 61, 639-649.
- Koyani, C.N., Windischhofer, W., Rossmann, C., Jin, G., Kickmaier, S., Heinzl, F.R., Groschner, K., Alavian-Ghavanini, A., Sattler, W., y Malle, E. (2014). 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-PGJ2 promotes inflammation and apoptosis in cardiomyocytes via the DP2/MAPK/TNF $\alpha$  axis. *International Journal of Cardiology* 173, 472-480.
- Kryczek, I., Wei, S., Keller, E., Liu, R., y Zou, W. (2007). Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292, C987-C995.
- Kuhns, M.S., Davis, M.M., y Garcia, K.C. (2006). Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity* 24, 133-139.
- Li, H., y Pauza, C.D. (2009). Effects of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) and rosiglitazone on human gammadelta2 T cells. *PLoS One* 4, 0007726.
- Liang, H.-E., Reinhardt, R.L., Bando, J.K., Sullivan, B.M., Ho, I.C., y Locksley, R.M. (2012). Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. *Nat Immunol* 13, 58-66.
- Lin, M.S., Chen, W.C., Bai, X., y Wang, Y.D. (2007). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits cell growth via apoptosis and arrest of the cell cycle in human colorectal cancer. *J Dig Dis* 8, 82-88.
- Liu, J.D., Lin, S.Y., Ho, Y.S., Pan, S., Hung, L.F., Tsai, S.H., Lin, J.K., y Liang, Y.C. (2003). Involvement of c-jun N-terminal kinase activation in 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2- and prostaglandin A1-induced apoptosis in AGS gastric epithelial cells. *Mol Carcinog* 37, 16-24.
- Liu, J.J., Huang, R.W., Lin, D.J., Peng, J., Wu, X.Y., Lin, Q., Pan, X.L., Song, Y.Q., Zhang, M.H., Hou, M., *et al.* (2005). Expression of survivin and bax/bcl-2 in peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induces apoptosis on human myeloid leukemia cells in vitro. *Ann Oncol* 16, 455-459.

Lu, S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 5, 17.

Lu, Y., Zhou, Q., Zhong, F., Guo, S., Hao, X., Li, C., Wang, W., y Chen, N. (2013). 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) modulates lipopolysaccharide-induced chemokine expression by blocking nuclear factor-kappaB activation via peroxisome proliferator activated receptor-gamma-independent mechanism in renal tubular epithelial cells. *Nephron Exp Nephrol* 123, 1-10.

Luo, C., Shaw, K.T., Raghavan, A., Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Perrino, B.A., Hogan, P.G., y Rao, A. (1996). Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8907-8912.

Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., y Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-2489.

Mao, Q., Deeley, R.G., y Cole, S.P. (2000). Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 275, 34166-34172.

Marui, N., Nishino, H., Sakai, T., Aoike, A., Kawai, K., y Fukushima, M. (1991).  $\Delta$ 12-Prostaglandin J2 mimics heat shock in inducing cell cycle arrest at G1 phase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179, 1662-1669.

Marx, N., Mach, F., Sauty, A., Leung, J.H., Sarafi, M.N., Ransohoff, R.M., Libby, P., Plutzky, J., y Luster, A.D. (2000). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activators Inhibit IFN- $\gamma$ -Induced Expression of the T Cell-Active CXC Chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in Human Endothelial Cells. *The Journal of Immunology* 164, 6503-6508.

Matsuda, S., y Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47, 119-125.

Minami, T. (2014). Calcineurin-NFAT activation and DSCR-1 auto-inhibitory loop: how is homeostasis regulated? *Journal of Biochemistry* 155, 217-226.

Minami, T., Horiuchi, K., Miura, M., Abid, M.R., Takabe, W., Noguchi, N., Kohro, T., Ge, X., Aburatani, H., Hamakubo, T., *et al.* (2004). Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J Biol Chem* 279, 50537-50554.

Monroy, M.A., Opperman, K.K., Pucciarelli, M., Yerrum, S., Berg, D.A., y Daly, J.M. (2007). The PPAR $\gamma$  ligand 15d-PGJ2 modulates macrophage activation after injury in a murine trauma model. *Shock* 28, 186-191 110.1097/shk.1090b1013e3180310982.

Moore, K.J., Rosen, E.D., Fitzgerald, M.L., Randow, F., Andersson, L.P., Altshuler, D., Milstone, D.S., Mortensen, R.M., Spiegelman, B.M., y Freeman, M.W. (2001). The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med* 7, 41-47.

Moraes, L.A., Piqueras, L., y Bishop-Bailey, D. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 110, 371-385.

Moriai, M., Tsuji, N., Kobayashi, D., Kuribayashi, K., y Watanabe, N. (2009). Down-regulation of hTERT expression plays an important role in 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* 34, 1363-1372.

- Mullally, J.E., Moos, P.J., Edes, K., y Fitzpatrick, F.A. (2001). Cyclopentenone prostaglandins of the J series inhibit the ubiquitin isopeptidase activity of the proteasome pathway. *J Biol Chem* 276, 30366-30373.
- Munoz, U., Bartolome, F., Esteras, N., Bermejo-Pareja, F., y Martin-Requero, A. (2008). On the mechanism of inhibition of p27 degradation by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in lymphoblasts of Alzheimer's disease patients. *Cell Mol Life Sci* 65, 3507-3519.
- Na, H.K., y Surh, Y.J. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochem Pharmacol* 66, 1381-1391.
- Nagasawa, T. (2015). CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Frontiers in Immunology* 6, 301.
- Napimoga, M.H., Vieira, S.M., Dal-Secco, D., Freitas, A., Souto, F.O., Mestriner, F.L., Alves-Filho, J.C., Grespan, R., Kawai, T., Ferreira, S.H., *et al.* (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway. *J Immunol* 180, 609-617.
- Natarajan, C., y Bright, J.J. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 production, IL-12 signaling and Th1 differentiation. *Genes Immun* 3, 59-70.
- Nencioni, A., Lauber, K., Grunebach, F., Brugger, W., Denzlinger, C., Wesselborg, S., y Brossart, P. (2002). Cyclopentenone prostaglandins induce caspase activation and apoptosis in dendritic cells by a PPAR-gamma-independent mechanism: regulation by inflammatory and T cell-derived stimuli. *Exp Hematol* 30, 1020-1028.
- Nencioni, A., Lauber, K., Grunebach, F., Van Parijs, L., Denzlinger, C., Wesselborg, S., y Brossart, P. (2003). Cyclopentenone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling. *J Immunol* 171, 5148-5156.
- Nicolaou, A., Mauro, C., Urquhart, P., y Marelli-Berg, F. (2014). Polyunsaturated Fatty Acid-derived lipid mediators and T cell function. *Front Immunol* 5.
- O'Reilly, M.A. (2004). Redox Activation of p21Cip1/WAF1/Sdi1: A Multifunctional Regulator of Cell Survival and Death. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 108-118.
- Oeste, C.L., y Perez-Sala, D. (2014). Modification of cysteine residues by cyclopentenone prostaglandins: interplay with redox regulation of protein function. *Mass Spectrom Rev* 33, 110-125.
- Oh-hora, M., y Rao, A. (2008). Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20, 250-258.
- Oh, J.Y., Giles, N., Landar, A., y Darley-USmar, V. (2008). Accumulation of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 adduct formation with Keap1 over time: effects on potency for intracellular antioxidant defence induction. *Biochem J* 411, 297-306.
- Pacienza, N., D'Atri, L.P., Pozner, R.G., Negrotto, S., Malaver, E., Torres, O., y Schattner, M. (2010). 15-deoxy-Delta12,14-PGJ2 induces cell cycle arrest and apoptosis of haematopoietic progenitors. *British Journal of Haematology* 148, 173-175.
- Pan, M.G., Xiong, Y., y Chen, F. (2013). NFAT gene family in inflammation and cancer. *Curr Mol Med* 13, 543-554.
- Panzer, U., Schneider, A., Guan, Y., Reinking, R., Zahner, G., Harendza, S., Wolf, G., Thaiss,

- F., y Stahl, R.A. (2002). Effects of different PPARgamma-agonists on MCP-1 expression and monocyte recruitment in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 62, 455-464.
- Park, S.-D., Cheon, S.Y., Park, T.-Y., Shin, B.-Y., Oh, H., Ghosh, S., Koo, B.-N., y Lee, S.-K. (2015). Intranuclear interactomic inhibition of NF- $\kappa$ B suppresses LPS-induced severe sepsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464, 711-717.
- Pasceri, V., Wu, H.D., Willerson, J.T., y Yeh, E.T. (2000). Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 101, 235-238.
- Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., y Glass, C.K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759-763.
- Patel, L., Pass, I., Coxon, P., Downes, C.P., Smith, S.A., y Macphee, C.H. (2001). Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPAR $\gamma$  agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Current Biology* 11, 764-768.
- Paul, S., y Schaefer, B.C. (2013). A new look at T cell receptor signaling to nuclear factor- $\kappa$ B. *Trends in Immunology* 34, 269-281.
- Paumi, C.M., Wright, M., Townsend, A.J., y Morrow, C.S. (2003). Multidrug resistance protein (MRP) 1 and MRP3 attenuate cytotoxic and transactivating effects of the cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy-Delta(12,14)prostaglandin J2 in MCF7 breast cancer cells. *Biochemistry* 42, 5429-5437.
- Pérez-Sala, D., Cernuda-Morollón, E., y Cañada, F.J. (2003). Molecular Basis for the Direct Inhibition of AP-1 DNA Binding by 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 51251-51260.
- Piva, R., Gianferretti, P., Ciucci, A., Taulli, R., Belardo, G., y Santoro, M.G. (2005). 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis in human malignant B cells: an effect associated with inhibition of NF-kappa B activity and down-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* 105, 1750-1758.
- Powell, W.S. (2003). 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2: endogenous PPARgamma ligand or minor eicosanoid degradation product? *J Clin Invest* 112, 828-830.
- Qin, C., Burghardt, R., Smith, R., Wormke, M., Stewart, J., y Safe, S. (2003). Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Agonists Induce Proteasome-dependent Degradation of Cyclin D1 and Estrogen Receptor  $\alpha$  in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 63, 958-964.
- Rajakariar, R., Hilliard, M., Lawrence, T., Trivedi, S., Colville-Nash, P., Bellingan, G., Fitzgerald, D., Yaqoob, M.M., y Gilroy, D.W. (2007). Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20979-20984.
- Raman, P., Kaplan, B.L., y Kaminski, N.E. (2012). 15-Deoxy-Delta(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J(2)-glycerol, a putative metabolite of 2-arachidonyl glycerol and a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, modulates nuclear factor of activated T cells. *J Pharmacol Exp Ther* 342, 816-826.
- Rao, A., Luo, C., y Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15, 707-747.
- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H.M., y Prabhakar, U. (2004). Comparative analysis



of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of Immunological Methods* 293, 127-142.

Renedo, M., Gayarre, J., Garcia-Dominguez, C.A., Perez-Rodriguez, A., Prieto, A., Canada, F.J., Rojas, J.M., y Perez-Sala, D. (2007). Modification and activation of Ras proteins by electrophilic prostanoids with different structure are site-selective. *Biochemistry* 46, 6607-6616.

Rhoades, K.L., Golub, S.H., y Economou, J.S. (1992). The regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *J Biol Chem* 267, 22102-22107.

Ricciotti, E., y FitzGerald, G.A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 986-1000.

Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., y Glass, C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82.

Richard, C.L., y Blay, J. (2008). CXCR4 in Cancer and Its Regulation by PPAR. *PPAR Research* 2008, 19.

Riediger, N.D., Othman, R.A., Suh, M., y Moghadasian, M.H. (2009). A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. *Journal of the American Dietetic Association* 109, 668-679.

Rodríguez, M., Domingo, E., Municio, C., Alvarez, Y., Hugo, E., Fernández, N., y Sánchez Crespo, M. (2014). Polarization of the Innate Immune Response by Prostaglandin E<sub>2</sub>: A Puzzle of Receptors and Signals. *Molecular Pharmacology* 85, 187-197.

Roebuck, K.A., Carpenter, L.R., Lakshminarayanan, V., Page, S.M., Moy, J.N., y Thomas, L.L. (1999). Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B. *Journal of Leukocyte Biology* 65, 291-298.

Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., y Spiegelman, B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14, 1293-1307.

Rossi, A., Elia, G., y Santoro, M.G. (1996). 2-Cyclopenten-1-one, a new inducer of heat shock protein 70 with antiviral activity. *J Biol Chem* 271, 32192-32196.

Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., y Santoro, M.G. (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ B kinase. *Nature* 403, 103-118.

Rovin, B.H., Lu, L., y Cosio, A. (2001). Cyclopentenone Prostaglandins Inhibit Cytokine-Induced NF- $\kappa$ B Activation and Chemokine Production by Human Mesangial Cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 12, 1659-1667.

Rozera, C., Carattoli, A., De Marco, A., Amici, C., Giorgi, C., y Santoro, M.G. (1996). Inhibition of HIV-1 replication by cyclopentenone prostaglandins in acutely infected human cells. Evidence for a transcriptional block. *J Clin Invest* 97, 1795-1803.

Rudd, C.E., Taylor, A., y Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* 229, 12-26.

- Russell, F.D., y Bürgin-Maunders, C.S. (2012). Distinguishing Health Benefits of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids. *Marine Drugs* 10, 2535-2559.
- Sánchez-Gómez F.J. (2008). Papel de la modificación covalente de proteínas en los efectos biológicos de la prostaglandina 15-desoxi- $\Delta$ 12,14-PGJ2. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Fac de Biol. 154p.
- Sanchez-Gomez, F.J., Cernuda-Morollon, E., Stamatakis, K., y Perez-Sala, D. (2004). Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* 66, 1349-1358.
- Sancho, D., Gomez, M., y Sanchez-Madrid, F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 26, 136-140.
- Sancho, R., Macho, A., de La Vega, L., Calzado, M.A., Fiebich, B.L., Appendino, G., y Munoz, E. (2004). Immunosuppressive activity of endovanilloids: N-arachidonoyl-dopamine inhibits activation of the NF-kappa B, NFAT, and activator protein 1 signaling pathways. *J Immunol* 172, 2341-2351.
- Santoro, M.G. (1997). Antiviral activity of cyclopentenone prostanoids. *Trends in Microbiology* 5, 276-281.
- Sawano, H., Haneda, M., Sugimoto, T., Inoki, K., Koya, D., y Kikkawa, R. (2002). 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 61, 1957-1967.
- Scher, J.U., y Pillinger, M.H. (2009). The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med* 57, 703-708.
- Schulz, R.A., y Yutzey, K.E. (2004). Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Developmental Biology* 266, 1-16.
- Serrador, J.M., Nieto, M., y Sánchez-Madrid, F. (1999). Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends in Cell Biology* 9, 228-233.
- Shaulian, E. (2010). AP-1 — The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cellular Signalling* 22, 894-899.
- Shaulian, E., y Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390-2400.
- Shibata, T., Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., y Uchida, K. (2002). 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2: a prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *Journal of Biological Chemistry* 277, 10459-10466.
- Shimada, T., Kojima, K., Yoshiura, K., Hiraishi, H., y Terano, A. (2002). Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* 50, 658-664.
- Shin, S.W., Seo, C.Y., Han, H., Han, J.Y., Jeong, J.S., Kwak, J.Y., y Park, J.I. (2009). 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. *Clin Cancer Res* 15, 5414-5425.
- Shipkova, M., y Wieland, E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta* 413, 1338-1349.

- Sitara, D., y Aliprantis, A.O. (2010). Transcriptional regulation of bone and joint remodeling by NFAT. *Immunol Rev* 233, 286-300.
- Smyth, E.M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., y FitzGerald, G.A. (2009). Prostanoids in health and disease. *Journal of Lipid Research* 50, S423-S428.
- Srikanth, S., y Gwack, Y. (2013). Orai1-NFAT signalling pathway triggered by T cell receptor stimulation. *Mol Cells* 35, 182-194.
- Stamatakis, K., Sanchez-Gomez, F.J., y Perez-Sala, D. (2006). Identification of novel protein targets for modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in mesangial cells reveals multiple interactions with the cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol* 17, 89-98.
- Straus, D.S., y Glass, C.K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* 21, 185-210.
- Straus, D.S., y Glass, C.K. (2007). Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends in Immunology* 28, 551-558.
- Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H., Sengchanthalangsy, L.L., Ghosh, G., y Glass, C.K. (2000). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4844-4849.
- Subbaramaiah, K., Lin, D.T., Hart, J.C., y Dannenberg, A.J. (2001). Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Ligands Suppress the Transcriptional Activation of Cyclooxygenase-2: Evidence for involvement of Activator Protein-1 and CREB binding protein/p300. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12440-12448.
- Surh, Y.-J., Na, H.-K., Park, J.-M., Lee, H.-N., Kim, W., Yoon, I.-S., y Kim, D.-D. (2011). 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochemical Pharmacology* 82, 1335-1351.
- Suzuki, M., Mori, M., Niwa, T., Hirata, R., Furuta, K., Ishikawa, T., y Noyori, R. (1997). Chemical Implications for Antitumor and Antiviral Prostaglandins: Reaction of  $\Delta$ 7-Prostaglandin A1 and Prostaglandin A1 Methyl Esters with Thiols. *Journal of the American Chemical Society* 119, 2376-2385.
- Szabo, S.J., Gold, J.S., Murphy, T.L., y Murphy, K.M. (1993). Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF- $\kappa$ B and NF-ATc. *Mol Cell Biol* 13, 4793-4805.
- Takahashi, H.K., Iwagaki, H., Tamura, R., Katsuno, G., Xue, D., Sugita, S., Mori, S., Yoshino, T., Tanaka, N., y Nishibori, M. (2005). Differential effect of prostaglandins E1 and E2 on lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *European Journal of Pharmacology* 512, 223-230.
- Takeda, K., Ichiki, T., Tokunou, T., Iino, N., y Takeshita, A. (2001). 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones activate the MEK/ERK pathway through phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276, 48950-48955.
- Tanikawa, M., Yamada, K., Tominaga, K., Morisaki, H., Kaneko, Y., Ikeda, K., Suzuki, M., Kiho, T., Tomokiyo, K., Furuta, K., *et al.* (1998). Potent prostaglandin A1 analogs that suppress tumor cell growth through induction of p21 and reduction of cyclin E. *J Biol Chem* 273, 18522-18527.



- Teicher, B.A., y Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 16, 2927-2931.
- Thieringer, R., Fenyk-Melody, J.E., Le Grand, C.B., Shelton, B.A., Detmers, P.A., Somers, E.P., Carbin, L., Moller, D.E., Wright, S.D., y Berger, J. (2000). Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Does Not Inhibit IL-6 or TNF- $\alpha$  Responses of Macrophages to Lipopolysaccharide In Vitro or In Vivo. *The Journal of Immunology* 164, 1046-1054.
- Thomas, S.C., Ryan, M.A., Shanley, T.P., y Wong, H.R. (1998). Induction of the stress response with prostaglandin A1 increases I-kappaB $\alpha$  gene expression. *Faseb J* 12, 1371-1378.
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., y Pennington, D.J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 2563-2582.
- Verstrepen, L., y Beyaert, R. (2014). Receptor proximal kinases in NF- $\kappa$ B signaling as potential therapeutic targets in cancer and inflammation. *Biochemical Pharmacology* 92, 519-529.
- Wall, S.B., Oh, J.Y., Mitchell, L., Laube, A.H., Campbell, S.L., Renfrow, M.B., y Landar, A. (2015). Rac1 modification by an electrophilic 15-deoxy Delta(12,14)-prostaglandin J2 analog. *Redox Biol* 4, 346-354.
- Wang, D., y Dubois, R.N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 181-193.
- Wang, J.J., y Mak, O.T. (2011). Induction of apoptosis by 15d-PGJ2 via ROS formation: an alternative pathway without PPAR $\gamma$  activation in non-small cell lung carcinoma A549 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 94, 104-111.
- Wang, P., Anderson, P.O., Chen, S., Paulsson, K.M., Sjogren, H.O., y Li, S. (2001). Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Int Immunopharmacol* 1, 803-812.
- Wang, R.C., y Jiang, D.M. (2014). PPAR-gamma agonist pioglitazone affects rat gouty arthritis by regulating cytokines. *Genet Mol Res* 13, 6577-6581.
- Wang, X., Lin, H., y Gu, Y. (2012). Multiple roles of dihomo-gamma-linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids Health Dis* 11, 11-25.
- Wilkins, B.J., y Molkenin, J.D. (2004). Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 1178-1191.
- Wisniewska, M.B., Ameyar-Zazoua, M., Bakiri, L., Kaminska, B., Yaniv, M., y Weitzman, J.B. (2007). Dimer Composition and Promoter Context Contribute to Functional Cooperation between AP-1 and NFAT. *Journal of Molecular Biology* 371, 569-576.
- Xin, X., Yang, S., Kowalski, J., y Gerritsen, M.E. (1999). Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Ligands Are Potent Inhibitors of Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 274, 9116-9121.
- Xu, P., Lou, X.L., Chen, C., y Yang, Z.W. (2013). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation on apoptosis in rats with acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 58, 3516-3523.
- Yamaguchi, S., Aldini, G., Ito, S., Morishita, N., Shibata, T., Vistoli, G., Carini, M., y Uchida,

K. (2010). Delta12-prostaglandin J2 as a product and ligand of human serum albumin: formation of an unusual covalent adduct at His146. *J Am Chem Soc* 132, 824-832.

Yamamoto, N., Rahman, M.M., Fukushima, M., Maeno, K., y Nishiyama, Y. (1989). Involvement of prostaglandin-induced proteins in the inhibition of herpes simplex virus replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 158, 189-194.

Yang, X.Y., Wang, L.H., Chen, T., Hodge, D.R., Resau, J.H., DaSilva, L., y Farrar, W.L. (2000). Activation of Human T Lymphocytes Is Inhibited by Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Agonists: PPAR $\gamma$  co-association with transcription factor NFAT. *Journal of Biological Chemistry* 275, 4541-4544.

Yen, C.C., Hsiao, C.D., Chen, W.M., Wen, Y.S., Lin, Y.C., Chang, T.W., Yao, F.Y., Hung, S.C., Wang, J.Y., Chiu, J.H., *et al.* (2014). Cytotoxic effects of 15d-PGJ2 against osteosarcoma through ROS-mediated AKT and cell cycle inhibition. *Oncotarget* 5, 716-725.

Yoeli-Lerner, M., Yiu, G.K., Rabinovitz, I., Erhardt, P., Jauliac, S., y Toker, A. (2005). Akt Blocks Breast Cancer Cell Motility and Invasion through the Transcription Factor NFAT. *Molecular Cell* 20, 539-550.

You, Q., Cheng, L., Kedl, R.M., y Ju, C. (2008). Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* 48, 978-990.

Yuan, Z., Liu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Kishimoto, C., Ma, A., y Liu, Z. (2004). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Ligands Ameliorate Experimental Autoimmune Myocarditis Associated with Inhibition of Self-Sensitive T Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 43, 868-875.

Yuhki, K.-i., Kojima, F., Kashiwagi, H., Kawabe, J.-i., Fujino, T., Narumiya, S., y Ushikubi, F. (2011). Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacology & Therapeutics* 129, 195-205.

Zhang, X., Wang, J.M., Gong, W.H., Mukaida, N., y Young, H.A. (2001). Differential Regulation of Chemokine Gene Expression by 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$  Prostaglandin J2. *The Journal of Immunology* 166, 7104-7111.

Zia, P., Golub, M., y Horton, R. (1975). A radioimmunoassay for prostaglandin A1 in human peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 41, 245-252.

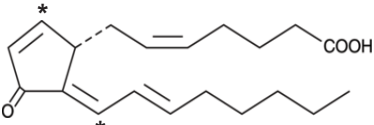
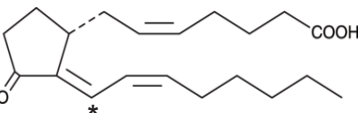
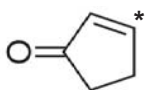
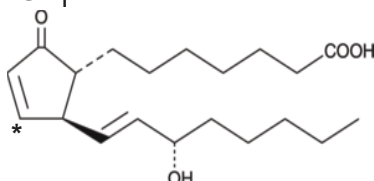
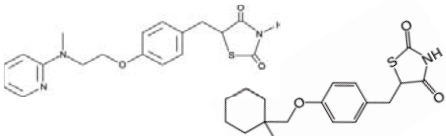
Zusman, R.M., Caldwell, B.V., Speroff, L., y Behrman, H.R. (1972). Radioimmunoassay of the A prostaglandins. *Prostaglandins* 2, 41-53.



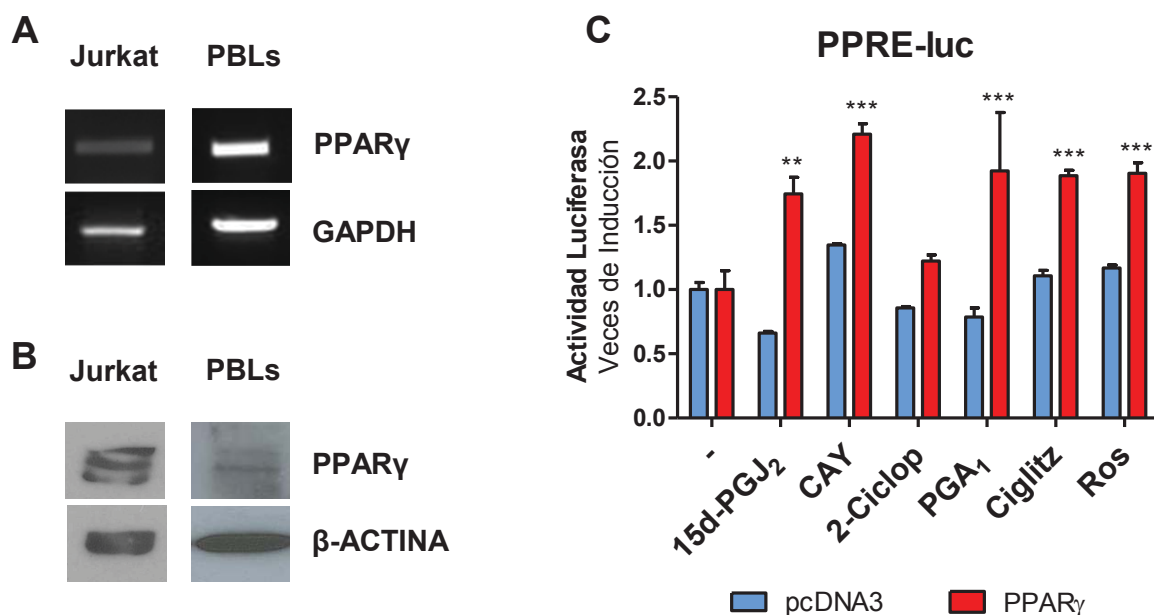
## MATERIAL SUPLEMENTARIO

---



COMPUESTO	MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	ACTIVACIÓN DE PPAR $\gamma$
<b>15 desoxi-<math>\Delta^{12,14}</math>-PGJ<math>_2</math></b> 	++++	++
<b>CAY10410</b> <b>(9,10 dihidro-15d<math>\Delta^{12,14}</math>-PGJ<math>_2</math>)</b> 	+	+++
<b>2-Ciclopenten-1-ona</b> 	++++	-
<b>PGA<math>_1</math></b> 	+++	+++
<b>Rosiglitazona / Ciglitazona</b> 	-	+++

**Figura S1: Esquema de la capacidad de las CyPGs y sus análogos para modificar proteínas o activar a PPAR $\gamma$ .** La presencia de carbonilos electrófilos en las moléculas determina la capacidad de unión de estos compuestos a proteínas. La capacidad de activar a PPAR $\gamma$  está restringida a aquellos compuestos con propiedades como ligandos de este receptor. (Modificado de Sánchez-Gómez, 2008).



**Figura S2: Expresión y activación de PPAR $\gamma$  en células T.** La expresión de PPAR $\gamma$  en células Jurkat y en PBLs humanos se analizó, tanto a nivel de ARNm mediante RT-PCR, incluyendo la amplificación de GAPDH como control (**A**), como a nivel de proteína mediante *Western blot*, usando como control la expresión de  $\beta$ -Actina (**B**). (**C**) Células Jurkat fueron co-transfectadas con el plásmido reportero PPRE-luc junto con un vector de expresión de PPAR $\gamma$  o el vector vacío pcDNA3 como control. Las células se trataron con 15d-PGJ<sub>2</sub> (7,5  $\mu$ M), CAY10410 (CAY, 7,5  $\mu$ M), 2-Ciclopenten-1-ona (2-Ciclop, 250  $\mu$ M), PGA<sub>1</sub> (10  $\mu$ M), Ciglitazona (Ciglitiz, 10  $\mu$ M) o Rosiglitazona (Ros, 10  $\mu$ M) durante 18 horas. Los datos están representados como veces de inducción ( $RLU_{\text{muestra}}/RLU_{\text{control}} \pm SD$ ). Los resultados corresponden a triplicados, y están normalizados respecto a la concentración de proteína presente en los lisados. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al control (-).

Símbolo	Nombre del gen
HSGenomic	HSGenomic
Hs18s	Hs18s
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3
CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20
CCL3L1	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1
CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2
CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6
CD19	CD19 molecule
CD22	CD22 molecule
CD3EAP	CD3e molecule, epsilon associated protein
CD4	CD4 molecule
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
CD5	CD5 molecule
CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)
CD69	CD69 molecule
CD8A	CD8a molecule
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
CSF3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
CXCR2	chemokine (C-X-C motif) receptor 2
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
EBF1	early B-cell factor 1
ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FOXP3	forkhead box P3
GZMB	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
HFE	hemochromatosis
HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C
HMGB1	high-mobility group box 1
HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A
ICOS	inducible T-cell co-stimulator
IFNG	interferon, gamma
IL13	interleukin 13
IL1R1	interleukin 1 receptor, type I
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1
IL2	interleukin 2



Símbolo	Nombre del gen
IL21R	interleukin 21 receptor
IL23A	interleukin 23, alpha subunit p19
IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha
IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)
IL3	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
IL4	interleukin 4
IL4R	interleukin 4 receptor
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
IL7	interleukin 7
IL7R	interleukin 7 receptor
IL8	interleukin 8
ITGA1	integrin, alpha 1
KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1
KLRK1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
LEP	leptin
LTA	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
MASP2	mannan-binding lectin serine peptidase 2
MIF	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
MSR1	macrophage scavenger receptor 1
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
NFATC2	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NLRP2	NLR family, pyrin domain containing 2
NOS2	nitric oxide synthase 2, inducible
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule
PLAU	plasminogen activator, urokinase
PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
RORC	RAR-related orphan receptor C
RUNX1	runt-related transcription factor 1
SLAMF1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1
TLR4	toll-like receptor 4
TLR9	toll-like receptor 9
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator
TNFRSF17	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
TNFRSF4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TNFSF11	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ACTB	actin, beta

**Tabla Suplementaria 1.** Lista de los 96 genes analizados mediante RT-PCR cuantitativa (*StellARray*).

15d-PGJ <sub>2</sub> vs C		PGA <sub>1</sub> vs C	
Gen	Número de veces	Gen	Número de veces
CCL5	2,51	CD8A	2,21
CCR6	2,34	CDKN1A	2,55
CD19	5,55	CEACAM1	2,58
CDKN1A	4,76	GZMB	7,11
CSF3	7,42	IL2RA	8,46
CSF3R	3,49	IL8	2,89
CXCL3	8,67	KLRD1	2,27
EBF1	3,83	TNFRSF1B	3,79
FOS	4,85	CCL4	-4,08
HFE	2,53	CCR2	-4,45
HSPA1A	54,13	CD3EAP	-2,27
ICOS	12,96	CSF2	-18,64
IL13	2,15	HSP90B1	-2,29
IL21R	3,05	IL2	-3,01
IL23A	2,25	IL3	-13,77
IL2RA	16,07	ITGA1	-2,05
IL6	4,83		
IL7R	2,22		
IL8	463,66		
KLRD1	15,68		
KLRK1	2,19		
NFKBIA	2,39		
NOS2	3,28		
PLAU	2,12		
TLR4	2,25		
TNF	2,47		
TNFRSF11A	2,01		
TNFRSF17	2,87		
TNFSF11	2,49		
CASP2	-2,32		
CCR2	-4,49		
CD3EAP	-2,03		
CD4	-3,07		
CD5	-2,88		
CSF2	-8,93		
CXCR4	-3,52		
HMGB1	-2,89		
HSP90B1	-2,14		
IL2	-3,44		
IL3	-14,47		
MIF	-2,66		
PECAM1	-3,34		
RORC	-5,16		
RUNX1	-2,43		
TLR9	-2,31		

**Tabla Suplementaria 2.**

Lista de genes analizados mediante RT-PCR cuantitativa (*StellARray*), que ven alterada su expresión tras el tratamiento con 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> (10 µM) respecto al tratamiento control (células sin estimular). Los datos están representados como la media de veces que la expresión aumenta (rojo) o disminuye (verde) respecto a los niveles en situación control.

		TPA+Ion vs C	
		TNFRSF4 ZAP70	-19,26 -3,50
Gen	Número de veces	Gen	Número de veces
CCL5	442,61	PLAU	15,84
CCL4	8840,74	PTGS2	1674,50
BIRC3	36,07	SLAMF1	66,65
CCL20	4702,69	TNF	304,43
CCL3L1	810,72	TNFRSF1B	19,72
CD44	123,81	TNFRSF4	5,95
CD55	6,79	TNFSF11	23,33
CD69	34,60	TRAF1	118,89
CDKN1A	35,08	CCR2	-16,97
CSF2	4148,49	CD3EAP	-2,39
CXCL3	16,44	CD4	-3,80
FAS	4,59	CXCR4	-36,97
FASLG	9,97	HMGB1	-2,49
FOS	14,64	IL7R	-2,19
FOXP3	4,83	ITGA1	-5,10
GZMB	1991,91	LEF1	-8,38
HFE	3,02	PECAM1	-14,02
HLA-A	4,17	RORC	-2,48
HLA-C	2,40	RUNX1	-4,35
HSP90B1	2,48		
ICOS	122,74		
IFNG	171,03		
IL13	510,34		
IL1R1	333,99		
IL1RL1	50,54		
IL2	9928,26		
IL23A	526,58		
IL2RA	2653,37		
IL3	4496,85		
IL4	6,14		
IL4R	32,84		
IL6	48,95		
IL8	4503,38		
KLRD1	15,00		
KLRK1	23,68		
LTA	5,04		
NFATC1	8,68		
NFKB1	8,34		
NFKB2	23,94		
NFKBIA	19,95		

**Tabla Suplementaria**

**3.** Lista de genes analizados mediante RT-PCR cuantitativa (*StellARray*), que ven alterada su expresión tras el tratamiento con TPA 5 ng/ml + ionóforo de calcio (Ion, 1  $\mu$ M) respecto al tratamiento control (células sin estimular). Los datos están representados como la media de veces que la expresión aumenta (rojo) o disminuye (verde) respecto a los niveles en situación control.

15d-PGJ <sub>2</sub> +TI vs TPA+Ion	
Gen	Número de veces
CD19	3,20
CD55	6,43
CSF3	2,18
CXCL3	63,17
EBF1	3,82
FCGR2B	3,30
FOS	9,63
HSPA1A	364,67
IL7R	25,50
IL8	267,61
ITGA1	5,67
NOS2	3,54
PPARG	69,16
TNFRSF11A	4,75
TNFRSF17	2,34
CCL5	-5,95
CCL4	-26,13
BIRC3	-4,83
CCL3L1	-9,34
CD4	-3,20
CD44	-3,73
CD5	-5,75
CSF2	-6,98
FAS	-3,15
ICOS	-3,33
IL13	-3,86
IL1R1	-16,15
IL1RL1	-3,27
IL2	-2,37
IL23A	-2,17
IL2RA	-5,67
IL3	-204,03
IL4R	-10,39
IL6	-2,14
MASP2	-2,20
MIF	-2,21
NFATC1	-3,05
NFKB2	-4,15
NFKBIA	-2,29
RORC	-8,07
SLAMF1	-9,72
TLR9	-3,40
TNF	-3,39
TNFRSF1B	-10,84
TNFRSF4	-14,17
TNFSF10	-4,00
TRAF1	-2,59
ZAP70	-2,89

PGA <sub>1</sub> +TI vs TPA+Ion	
Gen	Número de veces
CXCL3	3,35
CXCR4	3,67
IL13	3,50
CCL5	-4,46
CCL4	-6,99
CCL3L1	-4,93
CD44	-2,95
CD5	-2,48
CEACAM1	-2,37
CSF2	-2,71
FASLG	-2,98
GZMB	-2,98
IFNG	-3,50
IL1R1	-4,53
IL2	-3,28
IL3	-4,89
IL6	-4,32
PTGS2	-3,52
TNF	-4,17
TNFRSF1B	-7,59

**Tabla Suplementaria**

**4.** Lista de genes analizados mediante RT-PCR cuantitativa (*StellARray*), que ven alterada su expresión en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> o PGA<sub>1</sub> (10 µM) una hora antes del tratamiento con TPA (15 ng/ml) + ionóforo de calcio (Ion, 1 µM) (TI), respecto al tratamiento en ausencia de CyPGs (TPA+Ion). Los datos están representados como la media de veces que la expresión aumenta (rojo) o disminuye (verde) respecto a los niveles en situación control.